

**BIOLOGISCHE UND SEROLOGISCHE AKTIVITÄT
VON STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B
NACH EINWIRKUNG PHYSIKALISCHER
UND CHEMISCHER VERFAHREN**

Alexander Zietzer

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0027

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen
Ursprungs des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Lehrstuhl Prof. Dr. G. Terplan

BIOLOGISCHE UND SEROLOGISCHE AKTIVITÄT VON
STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B NACH EINWIRKUNG
PHYSIKALISCHER UND CHEMISCHER VERFAHREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Alexander Zietzer

aus

Frankfurt/Main

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 28. Juli 1978



INHALTSÜBERSICHT

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1.	Wirkungen von Staphylokokken-Enterotoxinen auf Säuger	2
2.1.1.	Klinische Befunde	2
2.1.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	6
2.2.	Wirkungen von Staphylokokken-Enterotoxinen auf Zellkulturen	9
2.3.	Serologische Enterotoxinnachweisverfahren	14
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
3.1.	Eignung von Zellkulturen zum Nachweis der biologischen Aktivität von SEB	16
3.1.1.	Material und Methodik	16
3.1.1.1.	SEB	16
3.1.1.2.	Zellkulturen	18
3.1.2.	Ergebnisse	21
3.2.	Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die biologische und serologische Aktivität von SEB	27
3.2.1.	Material und Methodik	27
3.2.1.1.	SEB	27
3.2.1.2.	Zellkulturen	27
3.2.1.3.	Radiale Immunodiffusion	27
3.2.2.	Versuchsanordnung und Ergebnisse	30
3.2.2.1.	Physikalische Faktoren	30
3.2.2.1.1.	Erhitzung	30
3.2.2.1.2.	Ultraschallbehandlung	32

	Seite
3.2.2.1.3. Infrarotbestrahlung	32
3.2.2.1.4. Ultraviolette Bestrahlung	34
3.2.2.2. Chemische Faktoren	36
3.2.2.2.1. Peressigsäure	36
3.2.2.2.2. Wasserstoffperoxid	37
3.2.2.2.3. Natriumhypochlorit	37
3.2.2.2.4. Chloramin T	40
3.2.2.2.5. Formaldehyd	42
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	43
5. ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)	56
6. LITERATURVERZEICHNIS	59

1. EINLEITUNG

Verfahren zur Inaktivierung von Staphylokokken-Enterotoxinen zielen primär darauf ab, diese den Menschen gefährdenden Toxine in dessen Umgebung bzw. in Lebensmitteln unschädlich zu machen. Somit wäre auch der biologische Nachweis die adäquate Methode zur Prüfung der Effektivität eines Inaktivierungsverfahrens. Im Hinblick auf den großen Kostenaufwand, mit dem insbesondere der Affenfütterungstest, das zuverlässigste der biologischen Verfahren, verbunden ist, wurde bei Versuchen zur Inaktivierung häufig die serologische Aktivität als Kriterium der Verfahrenseffektivität herangezogen. Es liegen bisher noch keine gesicherten Ergebnisse vor, ob die biologische und die serologische Aktivität von Enterotoxinen, die inaktivierenden Einflüssen unterworfen waren, vergleichbar sind. Mir wurde daher die Aufgabe gestellt, diese Frage in Modellversuchen an gereinigtem Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) unter Einbeziehung von Zellkulturen zu prüfen. Dazu mußte zunächst untersucht werden, welche Zellkulturen zum Nachweis der biologischen Wirksamkeit angewandt werden können. In einem weiteren Versuchsabschnitt sollte dann der Einfluß von physikalischen Verfahren bzw. Chemikalien auf SEB geprüft werden, wobei für die biologische Aktivität die als geeignet befundenen Zellkulturen, für die serologische der einfache Radialdiffusionstest (MANCINI) als Kriterien vorgesehen waren.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Wirkungen von Staphylokokken-Enterotoxinen auf Säuger

2.1.1. Klinische Befunde

Staphylokokken-Enterotoxin verursacht beim Menschen Lebensmittelvergiftung mit den typischen Symptomen Durchfall und Erbrechen 2 bis 6 Stunden nach der Einnahme der kontaminierten Nahrung. Um genaue Kenntnisse über die wirksamen Dosen von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) beim Menschen zu erhalten, wurden bei freiwilligen Versuchspersonen die klinischen Symptome nach oraler Einnahme definierter Mengen von SEB registriert. 1 mcg bzw. 10 mcg gereinigtes SEB pro Person verursachten keine Vergiftungssymptome (BERGDOLL, 1969), jedoch traten bei 25 mcg pro Person nach 2 bis 4 Stunden Lebensmittelvergiftungssymptome wie Übelkeit, Leibschmerzen, Erbrechen und teilweise Durchfall auf (RAJ und BERGDOLL, 1969; DANGERFIELD, 1973). DANGERFIELD (1973) untersuchte die Wirkung von gereinigtem Enterotoxin A, B und C bei männlichen Versuchspersonen. Er legte als ID_{50} (Illness dose) die Dosis fest, bei der jeweils die Hälfte der Versuchspersonen erkrankte; die ID_{50} war bei den verschiedenen SE-Typen ähnlich und lag bei 0,14 mcg pro kg Körpergewicht (KGW); bei 0,4 mcg/kg KGW erkrankten alle Versuchspersonen. Bei 25 Min. auf 100 °C erhitztem SEB erkrankten lediglich 2 von 6 Personen bei Mengen von 0,4 mcg/kg KGW. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß Personen, die 1,6 Min. auf 100 °C erhitztes SEB einnahmen, schwerer erkrankten als Personen, die gleiche Dosen unerhitztes SEB erhielten. Die hämatologischen Befunde bestätigten den heftigen klinischen Erkrankungsverlauf bei diesen Personen.

Nach Aufnahme enterotoxinhaltiger Nahrungsmittel, also der eigentlichen Lebensmittelvergiftung, traten Speichelfluß, Übelkeit, dann Erbrechen, Leibschmerzen, Durchfall, z. T. blutig, schleimig, Schweißausbrüche, Kopfschmerzen, Tachycardie, Wadenkrämpfe sowie Fieber

auf (BARBER, 1914; KIENITZ, 1962; BERGDOLL, 1970 u.a.). Als bedrohlich wurden Absenkung der Körpertemperatur und des Blutdruckes angesehen. Todesfälle wurden bei Neugeborenen beschrieben (KIENITZ, 1962). Die Restitution erfolgt im allgemeinen nach 48 Stunden, bei geschwächten Patienten später. Laborerkrankungen, die als Folge unachtsamer Handhabung von Enterotoxin (orale Aufnahme gelösten Enterotoxins beim Pipettieren) auftraten, manifestierten sich mit den typischen Vergiftungserscheinungen (MEYER, 1953; KIENITZ, 1962). Am eigenen Institut wurden wiederholt einige Stunden nach dem Abwiegen von lyophilisiertem SEB und dem dabei unvermeidlichen Aufwirbeln geringer Mengen des staubartigen Materials bei den Mitarbeitern schmerzhafte Konjunktivitiden mit Rötung und Schwellung sowie entzündliche Rötung der Sklera beobachtet. Beim Einatmen des staubartigen SEB waren Husten, asthmaähnliche Atembeschwerden, z.T. grippeartige Symptome mit Kopfschmerzen und Fieber festzustellen. Die für die Intoxikation typischen Symptome Übelkeit, Erbrechen und Durchfall traten bemerkenswerterweise in keinem Fall auf. Die Erscheinungen waren nach 24 bis 48 Stunden wieder abgeklungen. Zwar war eine gewisse Empfindlichkeitsabnahme bei häufigem Kontakt mit SEB feststellbar, doch konnten die angeführten Symptome erst vollständig vermieden werden, nachdem Schutzbrille und Atemmaske getragen wurden.

Affen wurden in vielen Untersuchungen als Nachweissystem für Staphylokokken-Enterotoxin (SE) verwendet und auch in einer Reihe von Versuchen zum Wirkungsmechanismus von SE eingesetzt. Die höchste Empfindlichkeit weisen Schimpansen auf (WILSON, 1959), die aus naheliegenden Gründen aber für die Versuche nicht in Frage kommen. Die meisten Experimente wurden mit Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) gemacht, denen Kulturfiltrat oder gereinigtes Toxin mit der Schlundsonde (Affenfütterungstest) bzw. parenteral verabreicht wurde. Die intravenöse Gabe von SE bringt lediglich bei gereinigtem Toxin gesicherte Ergebnisse, ansonsten können durch Begleitsubstanzen falschpositive Resultate hervorgerufen werden (s.a. Übersicht von GANTZE, 1976). SCHANTZ et al. (1965)

ermittelten in einem Versuch mit mehr als 200 Rhesusaffen Erbrechen und Durchfall bei 50 % der Tiere nach intravenöser Gabe von 0,1 mcg gereinigtem SEB/kg KGW, während bei oraler Gabe für gleiche Effekte 0,9 mcg SEB/kg KGW erforderlich waren und damit erheblich mehr als beim Menschen. Vereinzelt wurde auch auf das Vorkommen primär gegen SE unempfindlicher Tiere hingewiesen (z. B. SURGALLA und HITE, 1945). Außerdem kommt es nach wiederholter Fütterung mit gleichem SE zu einer Abnahme der Empfindlichkeit und temporären Resistenz der Affen (SUGIYAMA et al., 1962). Nur bei Einhaltung einer mehrwöchigen Ruhezeit reagierten derartige Versuchstiere wieder mit der ursprünglichen Empfindlichkeit.

Die überzeugendsten Studien zur Aufklärung des enterotoxinbedingten Erbrechens bei Affen stammen von SUGIYAMA und Mitarbeitern. Nachdem in ersten Versuchen festgestellt worden war, daß das enterotoxinbedingte Erbrechen durch Dihydroergotamin verstärkt und durch Phenothiazin verhindert wurde, wurde von SUGIYAMA et al. (1961) ermittelt, daß die bilaterale Zerstörung der Area postrema, die am Boden des vierten Ventrikels gelegen ist, bei Rhesusaffen zu einer vollständigen Unempfindlichkeit gegenüber oral verabreichtem SE führte. Verfütterung von Kupfersulfat und Hirnsektion bewiesen jedoch, daß der Brechreflex und das Brechzentrum unbeeinflußt waren. Vagotomie in Höhe des Zwerchfelles verhinderte demgegenüber das Erbrechen nicht bei allen Tieren. Als Ursache dafür wurden bei der Neurektomie nicht erfaßte Seitenäste vermutet (SUGIYAMA et al., 1961). In weiteren Versuchen fanden SUGIYAMA und HAYAMA (1964), daß vagotomierte Affen eine höhere Toleranz gegenüber per os verabreichtem SE aufwiesen als gegenüber intravenös verabfolgtem SE. Sie konnten damit auch die bis dahin bestehenden Differenzen zu den Versuchen mit Katzen klären (CLARK et al., 1962), bei denen nach Vagotomie keine erhebliche Wirkungsabnahme des intravenös injizierten SE zu beobachten war. In einer weiteren Arbeit legten SUGIYAMA und HAYAMA (1965) dann dar, daß der primäre Angriffspunkt für die emetische Wirkung von SE in den Bauch-

organen liegen muß. Die afferente Erregung erreicht das Brechzentrum offensichtlich über den Vagus sowie über sympathische Fasern. Bei Vagotomie und abdominaler Sympathektomie blieb nämlich die emetische Wirkung des SE - selbst bei letalen Dosen - aus, obwohl bestimmte Emetika mit anderen Rezeptoren, wie z.B. Veriloid, noch immer zum Erbrechen führten.

Eine Vielzahl von Autoren beschäftigte sich mit den Einflüssen von SE auf den Blutkreislauf bzw. mit dem Verbleib von intravenös appliziertem SE. So fanden SUGIYAMA et al. (1958) innerhalb von 6 bis 8 Stunden nach oraler Gabe von SE an Affen eine Erhöhung der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, die von CRAWLEY et al. (1966 b) für die intravenöse Gabe von SE bestätigt wurde. Dies steht offenbar im Zusammenhang mit einer gewebeschädigenden Wirkung von SE, möglicherweise im Magen-Darmtrakt (BERGDOLL, 1970). Weitere Veränderungen aufgrund der Enterotoxineinwirkung betreffen das weiße Blutbild, da es sowohl nach oraler (SUGIYAMA und McKISSIC, 1966) als auch nach intravenöser (CRAWLEY et al., 1966 a; SUGIYAMA und McKISSIC, 1966) Enterotoxingabe bei Affen zu einer Leukozytose kam. Dabei trat diese bei Verfütterung des Enterotoxins erheblich früher auf als das Erbrechen. Bei der intravenösen Applikation ging der Leukozytose eine Leukopenie voraus. Dies ist nach CRAWLEY et al. (1966 a) darauf zurückzuführen, daß das Enterotoxin z. T. an Leukozyten gebunden wird und diese Komplexe innerhalb kurzer Zeit in der Lunge aus dem Kreislauf herausgefiltert werden. Nach intravenöser Applikation verschwindet SE innerhalb kurzer Zeit aus dem Blut. Untersuchungen von CRAWLEY et al. (1966 a) zufolge waren z.B. innerhalb von weniger als 60 Sek. 60 % des verabfolgten SE nicht mehr im Blut nachweisbar. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch RAPOPORT et al. (1966) sowie MORRIS et al. (1967). Für die Entfernung des Enterotoxins aus dem Blut scheint nicht die Lunge (CRAWLEY et al., 1966 b), sondern die Niere die Hauptrolle zu spielen (MORRIS et al., 1967; RAPOPORT et al., 1967; NORMANN et al., 1969;

STAAB et al., 1969). Den Angaben von NORMANN et al. (1969) ist z.B. zu entnehmen, daß SE bereits nach 15 Sek. an der Oberfläche der Tubuluszellen der Niere zu finden war. SE wurde aber auch schnell zerstört und war nach weiteren 8 Stunden nicht mehr in der Niere nachzuweisen. Das zweitwichtigste Organ für die Entfernung von SE aus dem Blut ist offensichtlich die Leber (MORRIS et al., 1967; NORMANN et al., 1969), während der Lunge eine weniger bedeutende Rolle zuzukommen scheint. Außerdem war SE auch im Magen-Darmtrakt und in der Haut zu finden, nicht aber im Gehirn. Weitere Einzelheiten zu der Verteilung von intravenös verabfolgtem SE - auch bei resistenten bzw. zuvor mit spezifischem Antiserum versorgten Affen - können den Übersichtsarbeiten von BERGDOLL (1970) sowie MINOR und MARTH (1976) entnommen werden.

2.1.2. Pathologisch-anatomische Befunde

Pathologisch-anatomische Befunde von Sektionen beim Menschen nach Staphylokokkenintoxikationen sind nicht sehr zahlreich, da diese nur selten tödlich verlaufen und in diesen Fällen oft eine polyfaktorielle Ätiologie besteht, d.h. ein weiterer schwächender Faktor, wie hohes Alter des Patienten oder Sepsis bei Kleinkindern, hinzukommt (KIENITZ, 1962).

Eine Schilderung der Enterotoxineinwirkung im Magen bei überlebenden Patienten lieferte PALMER (1951), der mit einem Gastroskop lokalisierte Veränderungen sah, wie Schleimhautödem, Hyperämie der Magenwand, petechiale Blutungen und "eitriges" Sekret, die also das Bild einer akuten, katarrhalischen Gastritis ergeben. Nach 48 Stunden waren diese Veränderungen wieder verschwunden. Ob dieses eindrucksvolle Bild allein durch SE geprägt wird bzw. welchen Anteil daran die anderen Toxine haben, bleibt ungewiß. In diesem Sinne lassen sich nach KIENITZ (1962) auch die reichlich vorhandenen pathologisch-anatomischen Befunde von Staphylokokken-Enterocolitiden aus gleichen Gründen nicht beweiskräftig verwerten. Dennoch sei hier auf eine derartige Aufstellung von

SENN und LUNDGAARD-HANSEN (1956) hingewiesen.

Übersicht 1: Sektionsbefunde am Gastrointestinaltrakt (47 Fälle)

(SENN und LUNDGAARD-HANSEN, 1956)

	Magen	Duodenum	Jejunum u. Ileum	Colon	Rectum	ohne Lokalis.
Mucosa intakt	1	1	4	2	-	-
Mucosa injiziert	3	4	13	6	-	-
Submucöse Blutungen	5	2	7	3	3	-
Pseudomembranen	-	-	7	8	-	9
Ulcera, Nekrosen	-	-	7	8	-	-
Beteiligung mes- enterialer Drüsen	3					
Peritonitis	1					

Sichere Angaben erbringt der Tierversuch. KENT (1966) war der erste, der die pathologischen Befunde bei Rhesusaffen registrierte, denen zuvor gereinigtes SEB per os gegeben wurde. Dabei zeigte sich, daß die klinischen Symptome gut mit dem Grad der pathologischen Veränderungen im Magen-Darmtrakt korrelierten. Diese betrafen im Magen vor allem den Bereich des Mageneinganges und des Magenfundus. Nach 6 bis 8 Stunden waren die stärksten Veränderungen in Form entleerter Schleimzellen und fokaler neutrophiler Infiltrationen im Epithelbereich und der oberen Lamina propria zu finden. Die Zellen des parietalen Bereiches waren weniger stark betroffen. Die Veränderungen im Dünndarm waren im Jejunum besonders ausgeprägt (Zerstörung des Bürstensaumes an der Oberfläche des Epithels, Gestaltsveränderung der Zellen in eine kubische Form, neutrophile Infiltration ähnlich wie im Magen, Häufung mitotischer Zellen). Das Ileum wies geringer ausgeprägte Veränderungen der Epithelstruktur auf. KENT et al. (1966) untersuchten anschließend die Enzymaktivität der Magenschleimhaut (saure und alkalische Phosphatase, Glukose 6-Phosphatase, DPNH und TPNH Diaphorase, Succinat-Dehydro-

genase und Hexokinase), wobei in der kutanen Magenschleimhaut eine leichte Steigerung der sauren Phosphataseaktivität in den Hauptzellen gefunden wurde. Im Jejunum wurde ein rapider Abfall und eine rasche Wiederkehr der Enzymaktivität registriert. Die Veränderungen zeigten eine enge Korrelation mit den Strukturveränderungen der Schleimhaut, die bereits von KENT (1966) beschrieben worden war. MERRILL und SPRINZ (1968) beobachteten schließlich, daß es nach oraler Verabreichung von gereinigtem SEB bei Rhesusaffen im Jejunum insbesondere zu einer Schädigung der Mitochondrien der Darmepithelien und der Tunica propria kam. Die geschädigten Zellen waren hauptsächlich an der Spitze der Darmzotten zu finden. Die Veränderungen bestanden aus einer Schwellung der Mitochondrien, Trübung der Matrix und Gestaltsveränderungen der Cristae, während die übrigen Bestandteile der Zellen unverändert waren. Die degenerierten Mitochondrien, die lichtmikroskopisch gut als Vakuolen erkennbar waren, wurden innerhalb kurzer Zeit durch Regeneration ersetzt. SHEAHAN et al. (1970) fanden dann bei enzymhistochemischen Untersuchungen der Mucinbestandteile des Jejunums eine verstärkte Ausscheidung von Becherzellmucin und eine Entleerung der Zellvesikel in den Krypten, insbesondere ihrer sulfomucinhaltigen Komponenten. Daraus wurde gefolgert, daß SE den Stoffwechsel und/oder die Sekretion der Darmmucine beeinflusst.

Auch an der Lunge ließen sich pathologisch-anatomische Befunde erheben. So berichtete FEINGOLD (1967) von Affen, die an einer Enterotoxinvergiftung gestorben waren und häufig interstitielles Lungenödem mit lymphatischen Infiltrationen aufwiesen. Die Lungen waren 1,5 bis 2,5 mal schwerer als bei Kontrolltieren. An den Kapillaren und Venen wurden Läsionen und Nekrosen mit Ektasienbildung gefunden. Über eindeutig auf Enterotoxineinwirkung zurückzuführende pathologisch-anatomische Veränderungen wurde in der Literatur bisher nicht berichtet.

2.2. Wirkungen von Staphylokokken-Enterotoxinen auf Zellkulturen

Die Untersuchungen zur Wirkung von SE auf Zellkulturen erbrachten - wie aus der im folgenden referierten Literatur hervorgeht - z. T. widersprüchliche Ergebnisse.

GUERIN et al. (1962) berichteten als erste von einem Effekt gereinigter Staphylokokkentoxine (α -, β - bzw. δ -Hämolysine sowie Enterotoxin) auf embryonale Herzt fibroblastenzellkulturen von Hühnern. Die verschiedenen von Verunreinigungen freien Toxine erzeugten charakteristische cytopathische Effekte (CPE), die deutlich zu unterscheiden waren bezüglich der minimalen Letaldosis, dem Reaktionsablauf und der Morphologie der degenerierten Zellen. MILONE (1962) versuchte daraufhin, mit Zellkulturen ein biologisches Nachweissystem für SE zu schaffen. Zu diesem Zweck beobachtete er die Wirkung von SE auf verschiedene Zellkulturen sowie den Einfluß des Serumzusatzes, des Reinheitsgrades der SE (5 bis 95 %), der Hitzebehandlung der SE und der Neutralisation der SE mit spezifischen Antikörpern auf den Reaktionsausfall. Bei den verwendeten Zellen Hep-2, HeLa bzw. Human Heart bestand der CPE in Lückenbildung, Abrundung und Ablösung der Zellen von der Unterlage nach dreitägiger Exposition gegenüber SE. Die Reaktion bei 30 Min. auf 100 °C erhitztem SE war stark abgeschwächt. Ein ähnlicher Effekt war auch bei hochgereinigtem SE gegeben: Kulturfiltrat mit einem Enterotoxingehalt von 20 % schädigte z. B. die Zellen ab einer Konzentration von 25 mcg/ml, bei 95 % reinem SE waren 100 mcg/ml notwendig. Der Versuch, SE mit spezifischen Antikörpern zu neutralisieren, gelang nicht. Nicht eindeutig geklärt werden konnte die Frage, ob der Zusatz von Serum zum Kulturmedium einen Einfluß auf die SE-Wirkung hat. MILONE (1962) schloß aus diesen Ergebnissen, daß der CPE möglicherweise nicht vom Enterotoxin, sondern von anderen thermolabilen Substanzen erzeugt wurde. Allerdings räumte er ein, daß die Zytotoxizität von Staphylokokkenstamm zu Staphylokokkenstamm verschieden sein könne und in Vorversuchen SE von *St. aureus* 196 E auch nach Erhitzung einen deutlichen CPE auf Human Heart Zellen ausübte. KIENITZ und SCHMELTER

(1964) untersuchten die biologische Wirkung von Kulturfiltraten, die Enterotoxin und Hämolsine enthielten, von kommerziellem Staphylokokkentoxin (Behringwerke) sowie gereinigten Enterotoxinen auf Affennierenzellkulturen. Die Zellkulturen wurden vier bis fünf Tage vorbrütet, dann wurde das Medium abgegossen und neues Medium mit 5 % fetalem Rinderserum und "Toxin" in steigenden Konzentrationen zugegeben. Beim Zusatz von Kulturfiltrat stellten die Autoren Auflösung der Zellverbände fest, ohne aber quantitative Beziehungen zwischen einzelnen Toxinkomponenten und dem CPE erzielen zu können. Nach Zusatz von "Antitoxinen" (Staphylokokkenserum der Behringwerke bzw. α -Antitoxin) wurde die toxische Wirkung des Kulturfiltrats nicht vermindert, während nach Erhitzen der Kulturfiltrate für 30 Min. bei 100 °C kein CPE mehr erkennbar war. Mit zunehmendem Reinheitsgrad nahm der zellschädigende Effekt des Enterotoxins so ab, daß bei hochgereinigtem SE von *S. aureus* S 6 schließlich Veränderungen in der Struktur des Zellverbandes nicht mehr nachweisbar waren. KIENITZ und SCHMELTER (1964) schlossen daher einen spezifischen Effekt von SE auf Affennierenzellkulturen aus und bezeichneten sie zum Nachweis von SE als nicht geeignet.

SCHAEFFER et al. (1966) untersuchten die Wirkung von gereinigtem SEB (96 bis 99 % Reinheit) von *S. aureus* S 6 auf embryonale menschliche Intestinalzellen (Ileum und Jejunum). Die Zellkulturen wurden in Medien mit 10 % Humanserum angezüchtet und 1 Tag vor dem vollständigen Dichtwachsen mit serumfreiem Medium und dem zu prüfenden Toxin inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Zytotoxizität mikroskopisch festgestellt. Anschließend wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, um die Gesamteiweißmenge der Zellen pro Kulturansatz mit einem modifizierten Folintest zu bestimmen. Als ED₅₀ (Effective Dose), bei der die Proteinmenge nur mehr 50 % des Kontrollansatzes betrug, ermittelten sie 40 bis 60 mcg SEB pro ml Medium. Der CPE des SEB auf die menschlichen Intestinalzellen war durch Ablösung der Zellen von der Glaswand und Verklumpung charakterisiert. Variationen der Bikarbonat- sowie der Calciumkonzentration des Mediums und Zusätze von Penicillin und Streptomycin veränderten die Toxizitätsschwelle

des SEB nur geringfügig. Das Alter der Zellkultur vor SEB-Zusatz war von entscheidender Bedeutung für die Ermittlung des CPE, da dieser nur bei mindestens zwei Tage ohne Enterotoxin inkubierten Kulturen nachweisbar war. Die toxische Reaktion war enterotoxinspezifisch, da sie durch entsprechende Antikörper aufgehoben werden konnte. Dennoch erscheint den Autoren die Zellkultur als Nachweissystem für SE in Lebensmitteln nicht praktikabel, da die Nachweisgrenze mit 30 mcg Enterotoxin relativ hoch und eine eindeutige Zuordnung von Toxin und CPE erst nach aufwendigen Reinigungsverfahren möglich ist. Als Modellsystem zum Studium der biochemischen Wirkungsweise von SE hielten sie die Zellkultur jedoch für gut geeignet. In einer weiteren Arbeit (1967) beschrieben die gleichen Autoren einen hemmenden Einfluß des Trypsins auf die Zytotoxizität von SE bei den gleichen Zellen. Sie führten die bei den vorhergehenden Versuchen beobachtete anfängliche Indifferenz der Zellen auf eine "Schutzwirkung" des Trypsins zurück, die erst 2 Tage nach der Teilung aufgehoben sei. Die Toxinresistenz wuchs proportional der Expositionsdauer mit Trypsin bei der Trypsinierung der Zellen vor Versuchsansatz. SCHAEFFER (1970) untersuchte in einer weiteren Arbeit den Einfluß des Serumzusatzes im Zellkulturmedium auf die "SEB-Zellkultur Interaktion". Er verwendete hierfür 48 Stunden alte Zellkulturen von Human Intestine, KB, HeLa, Hep-2, Amnion-L bzw. Human Foreskin, die er parallel mit Humanserum, Kälberserum bzw. Pferdeserum im Medium ansetzte. Bei einem Zusatz von 100 mcg SEB pro ml Medium blieben die Kulturen unbeeinflusst, wenn sie in kälberserumhaltigem bzw. pferdeserumhaltigem Medium angesetzt wurden, während bei der Inkubation mit Humanserum eine deutliche Reaktion, außer bei Amnion-L-Zellen und Human Foreskin, feststellbar war. Mit HeLa und Human Intestine-Zellen untersuchte er außerdem noch den pathophysiologischen Ablauf und die Art der Zellschädigung, indem er 100 mcg SEB/ml zu den Versuchsansätzen gab und den Zeitpunkt einer sichtbaren Zellreaktion abwartete. 4 bis 8 Stunden nach dem Ansatz traten erste Zeichen eines CPE auf, der sich langsam verstärkte und schließlich zur teilweisen Ablösung der Zellen führte. Ein zu diesem Zeitpunkt vorgenommener Aus-

tausch des toxinhaltigen Mediums durch toxinfreies Medium führte nach 48 Stunden zu einer vollständigen Erholung der Zellen. Sogar abgelöste Zellen waren in der Lage, sich wieder an dem Boden des Kulturgefäßes anzuheften und zu vermehren. SCHAEFFER folgerte daraus, daß der CPE des SEB nicht letal sei.

HALLANDER und BENGTTSSON (1967) verwendeten außer HeLa und Affen-nierenzellkulturen primäre menschliche Nierenzellen, primäre fetale Colonzellen sowie Kälbernierenzellen mit einem Zusatz von 5 bis 10 % Kälberserum zum Medium. Die Inkubation der Zellen mit SE wurde so vollzogen, daß zuerst der dichtgewachsene Zellrasen in Petrischalen mit Agar überschichtet wurde und nach dem Erstarren Löcher eingestantzt sowie von den Zellen abgehoben wurden, bevor SE in die Löcher einpi-pettiert wurde. Nach 2 Stunden wurde das SE wieder entfernt und neutral-rothaltiger Agar in die Löcher gegeben. Nach 6 und 16 Stunden wurde der CPE anhand der mit Neutralrot angefärbten, toten Zellen ermittelt. Die Autoren konnten zytopathische Effekte (= Zelltod) nur bei den verschie-denen Hämolysinen feststellen, nicht jedoch bei SEB.

Im Gegensatz zu MILONE (1962), KIENITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTTSSON (1967) ließen die in der Folgezeit durchge-führten Untersuchungen wiederum wie bereits bei GUERIN et al. (1962) sowie SCHAEFFER et al. (1966) einen SE-Einfluß auf Zellkulturen er-kennen. GRIGOROVA und DANON (1968) untersuchten an primären mensch-lichen Nieren- bzw. Fibroblastenzellkulturen sowie an Hep-2, Detroit-6, KB bzw. Fl-Zellen die biologische Wirkung von 20 Min. bei 80 °C er-hitztem Kulturfiltrat von *S. aureus* 254 bzw. von *S. aureus* Wood 46. Letzterer bildet kein Enterotoxin, sondern alpha-Toxin. Die Zellkulturen wurden auf einem Medium mit 40 % Humanserum für 4 Tage angezüchtet und danach zum Toxintest mit 10 % Laktalbumin und 5 % Kälberserum im Medium angesetzt und 6 Tage lang täglich kontrolliert. Die Zellen zeigten bei Zusatz des SE-haltigen Kulturfiltrates bereits nach 24 Stunden Dege-nerationserscheinungen; sie rundeten sich ab und bildeten Rauigkeiten der Oberflächenmembran aus, der Kern vergrößerte sich und löste sich später auf. In den Röhrchen mit wärmebehandeltem alpha-Toxin von

S. aureus Wood 46 zeigte sich demgegenüber innerhalb von 6 Tagen keine Veränderungen des Zellrasens. Von den Autoren wurde der Zellkulturtest aufgrund des starken CPE des erhitzten Enterotoxins als eine geeignetere Möglichkeit zum Enterotoxinnachweis bezeichnet. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen URBACH et al. (1968), die die Wirkung von Kulturfiltrat verschiedener enterotoxinbildender Staphylokokken auf menschlichen Amnionzellen Fl, HeLa- bzw. Hühnerfibroblastenzellen testeten. Das Kulturfiltrat wurde unerhitzt und nach 30 Min. Kochen auf 2 bis 3 Tage vorbebrüteten Kulturen gegeben. Zellschädigende Effekte, wie plasmatische Granulationen und Abkuglung, waren beim erhitzten und unerhitzten Toxinzusatz nach 24 bis 48 Stunden zu erkennen. Am empfindlichsten gegenüber Enterotoxin erwiesen sich die Fl-Zellen. Vergleichstests mit dem Kulturfiltrat des enterotoxinnegativen Stammes Wood 46 erbrachten keine Reaktion der Zellen. Weitere Versuche zur Zytotoxizität von SE wurden von RAKAROWA et al. (1971) mit Kulturfiltraten von 8 im "kitten-test" positiven Staphylokokkenstämmen durchgeführt. Sie erhitzen die Filtrate für 30 Min. auf 100 °C bzw. versetzten sie mit Ascorbinsäure, um die Hämolyse zu eliminieren. Bei HeLa, Hep-2 und Heart Zellen erzielten sie mit diesem vorbehandelten Toxin gleich starke CPE. DE WAART et al. (1972) konnten bei Mäusefibroblasten- und Affennieren-Zellkulturen nur mit relativ hohen Enterotoxindosen einen CPE auslösen, während bei menschlichen embryonalen Lungen- bzw. HeLa-Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Enterotoxin vorlag. TERPLAN und ZAADHOF (1976) testeten eine Reihe von Zelllinien menschlicher und tierischer Herkunft sowie Primärzellkulturen tierischen Ursprungs auf Eignung zum Enterotoxinnachweis. Das Anzuchtmedium mit 10 % Kälberserum wurde sofort nach der Teilung mit SEB (mit einem Reinheitsgrad von 80 bis 90 %) versetzt und im Abstand von 24 Stunden ausgewertet. 72 Stunden nach Ansatz ließ sich bei HeLa Zellen ein CPE ab 62,5 mcg SEB/ml feststellen, bei SK ein solcher ab 31 mcg/ml. Nach 6 Tagen betrug die Minstdosis bei beiden Zellkulturen 15,6 mcg/ml. Bei den getesteten Primärkulturen (Kälbernieren, Kälbermilz, Hühnerfibroblasten) war nach 48stündiger Inkubation die Zellschädigung ab

62,5 mcg/ml sichtbar, ab dem 4. Tag bereits bei Konzentrationen von 31 mcg/ml. Mit Kälbermilzzellen ließen sich nach 7 Tagen auch bei 15 mcg SEB/ml deutliche Veränderungen registrieren. Die Kontrollproben waren zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten negativ.

2.3. Serologische Enterotoxinnachweisverfahren

Die für den serologischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen eingesetzten Verfahren sind im deutschen Schrifttum erst vor wenigen Jahren von SOMMERFELD und TERPLAN (1975) im Rahmen einer Übersichtsarbeit ausführlich besprochen worden. Infolgedessen soll an dieser Stelle nicht erneut auf diese Verfahren eingegangen werden. Abgesehen von kleineren Modifikationen, z. B. beim RIA (ORTH, 1977 a und b; POBER und SILVERMAN, 1977), wurden zwischenzeitlich der Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA-Test) und die Hemmung der Inaktivierung konjugierter Bakteriophagen als Methoden zum empfindlichen Nachweis von Enterotoxin zur Diskussion gestellt.

Erstmalig wurde von SAUNDERS (1974) über einen Enzymtest zum indirekten Nachweis von Enterotoxin A berichtet, ohne daß dabei das Verfahren eindeutig beschrieben wurde. Detaillierte Angaben zu diesem Test (Sandwich-Technik) erschienen dann 1977 von SAUNDERS und BARTLETT. Danach erfordern die Probenvorbereitungen und der Test selbst nur ca. 3 Stunden. Die Empfindlichkeit, die unter diesen Voraussetzungen mit 1,6 bis 3,2 ng/ml angegeben wurde, konnte durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 Stunden gesteigert werden (0,4 ng/ml). Von TERPLAN und SIMON (1976) bzw. SIMON und TERPLAN (1977) sowie von FEY und STIFFLER-ROSENBERG (1977) wurde der ELISA-Test als kompetitive Methode konzipiert, bei der Enzym-markiertes Antigen mit in der Probe enthaltenem Antigen um die Bindung mit dem an eine feste Phase gebundenen Antikörper konkurrieren. Beide Verfahren unterscheiden sich z. B. in der Art des verwendeten Enzyms (Peroxidase bzw. Phosphatase) und des Substrates (o-Dianisidin bzw. p-Nitrophenylphosphat),

der Reaktionszeit, (1 Stunde bzw. ca. 18 bis 24 Stunden) sowie der Empfindlichkeit (0,1 bis 1 ng/ml bzw. 5 bis 10 ng/ml). Nähere Angaben über den ELISA-Test enthält die Arbeit von SIMON (1973). Nach SCHWEER und FRIEDEL (1973) besteht zwar keine Überlegenheit gegenüber dem RIA, doch ist nicht auszuschließen, daß der ELISA-Test sich auch in der Routinediagnostik gegenüber dem RIA durchsetzen wird.

Die Hemmung der Inaktivierung konjugierter Bakteriophagen als Enterotoxin-Nachweisverfahren wurde von SCHEUBER (1977) beschrieben. Zu diesem Zweck werden Antiserum und Antigen 1 Stunde bebrütet, bevor mit Antigen konjugierte Phagen (T4-Bakteriophagen) zugesetzt werden. Nach 6 Stunden wird dann die Zahl der überlebenden Bakteriophagen bestimmt. Die Berechnung der prozentualen Hemmung erfolgt aus der Größenordnung der Inaktivierung in Gegenwart und Abwesenheit der Hemmsubstanz (Enterotoxin). Mit diesem Verfahren ließen sich zwar SEB-Konzentrationen zwischen 3 und 8 ng/ml nachweisen, doch wurde nicht geprüft, ob dieses Verfahren auch zum Nachweis von Enterotoxin in Lebensmitteln geeignet ist.

Da diese neueren Verfahren jedoch vor einem Einsatz auf breiter Ebene noch weiteren Untersuchungen hinsichtlich ihrer Eignung unterzogen werden müssen, werden in der Routine weiterhin die bewährten Methoden eingesetzt, und zwar für quantitative Nachweise der MANCINI-Test (MANCINI et al., 1965) bzw. der OUDIN-Test (OUDIN, 1952) und für qualitative Nachweise der OUCHTERLONY-Test in Form verschiedener Modifikationen (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die eigenen Untersuchungen lassen sich in zwei Hauptabschnitte gliedern. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Zellkulturen auf ihre Eignung zum Nachweis der biologischen Aktivität von SEB geprüft. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dann an den hierfür geeigneten Zellkulturen getestet, ob und inwieweit der Einfluß des SEB durch eine vorherige Behandlung (Erhitzung, Ultraschallbehandlung, IR- bzw. UV-Bestrahlung, Zusatz von Desinfektionsmitteln) verändert werden kann. Parallel dazu wurde die serologische Aktivität des behandelten bzw. zum Vergleich mitlaufenden unbehandelten SEB bestimmt.

3.1. Eignung von Zellkulturen zum Nachweis der biologischen Aktivität von SEB

3.1.1. Material und Methodik

3.1.1.1. SEB

Als Toxinproduzent wurde *S. aureus* 243 (ATCC 14458) verwendet. Die Züchtung geschah in 4 %igem Protein Hydrolysate Powder Medium bei 37 °C (Einzelheiten s. HELBER, 1977; LOCHER, 1977). Das für die Versuche verwendete SEB wurde am Institut aus mehreren Chargen SEB-Rohtoxin hergestellt, die nach dem ersten Reinigungsschritt zu einem Pool vereinigt und dann einem zweiten Reinigungsverfahren unterzogen worden waren. Dieser gereinigte Toxinpool wurde für alle Versuche verwendet. Die Reinigung erfolgte in Anlehnung an SCHANTZ et al. (1965) in folgender Weise: Kulturflüssigkeit wurde mit der vierfachen Menge Aqua dest. verdünnt, mit o-Phosphorsäure auf pH 6,4 eingestellt und mit einer ausreichenden Menge (25 g pro 2 Liter Kulturflüssigkeit) äquilibrierten (0,05 m, pH 6,4) Amberlites CG-50 (Serva) vermischt. Nach einstündigem Rühren wurde das Amberlite absetzen lassen und der Überstand abgegossen. Nach siebenmaligem Waschen mit Aqua dest. wurde das toxinhaltige Amberlite in eine Chromatographiesäule (30 x 8 cm) gepackt, mit Aqua dest. durchspült und mit Phosphatpuffer (0,5 m, pH 6,8),

der 0,25 m NaCl enthielt, eluiert. Die SEB-haltigen Fraktionen wurden gesammelt, dialysiert und lyophilisiert. Für den zweiten Reinigungsschritt - Säulenchromatographie über Sephadex G 75 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt) - wurde eine Chromatographiesäule (3,5 x 100 cm) unter Vermeidung von Luftblasenbildung mit dem vorbereiteten Sephadex gepackt (100 g werden in 1,5 l 0,02 m Phosphatpuffer (pH 6,8) suspendiert und für 3 Stunden im Dampftopf quellen lassen) und mit 0,02 m Phosphatpuffer (pH 6,8) von mindestens dreifachem Säulenvolumen durchspült. Nach Auftragen des gepoolten SEB des ersten Reinigungsschrittes wurde mit 0,02 m Phosphatpuffer pH 6,8 eluiert. Die aufgrund der Extinktion bei 277 nm gepoolten Fraktionen wurden sterilfiltriert, dialysiert, lyophilisiert (Christ Delta Ia) und danach bei -20 °C luftdicht verschlossen aufbewahrt. Der SEB-Gehalt des Lyophilisats wurde serologisch (MANCINI-Technik) und vergleichend spektrometrisch bei 277 nm bestimmt. Als Referenz diente Enterotoxin B von Serva. Dem Ergebnis des MANCINI-Tests zufolge enthielt das Lyophilisat 50 % SEB. Dieser Wert stimmte mit jenem, der bei der spektrometrischen Messung ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 6,9$) registriert wurde, sehr gut überein, da eine 100 % SEB enthaltende Lösung eine Extinktion ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) von 14,0 aufweist (SCHANTZ et al., 1965). Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (3,2) und der bei 277 nm (6,9) belief sich auf 0,46 und weist darauf hin, daß keine oder nur wenig Nukleinsäure im SEB-Präparat enthalten ist (SCHANTZ et al., 1965). Auch der Gehalt an Nuclease, der entsprechend der von CORDS und TATINI (1973) beschriebenen Methode quantitativ mit dem Toluidinblau-DNA-Agar (LACHICA et al., 1971) bestimmt wurde, ist recht niedrig. Er beträgt im Lyophilisat 0,6 %, nach Erhitzung des gelösten SEB für 20 Sek. bei 95 °C sogar weniger als 0,1 %. Mit Rinderblutagarplatten wurde das Enterotoxin auch auf Hämolyse geprüft. Zu diesem Zweck wurden 100 mcg SEB in 0,5 ml phys. Kochsalzlösung gelöst und mehrere Male 7 mcl davon in vorgestanzte Löcher pipettiert. Die Blutagarplatten wurden 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und für weitere 20 Stunden bei 4 °C gelagert. Es war jedoch keine Hämolyse erkennbar.

3.1.1.2. Zellkulturen

Unter den verschiedenen biologischen Enterotoxin-Versuchssystemen werden neben dem Affenfütterungstest (SURGALLA et al., 1953) auch Zellkulturen genannt (MILONE, 1962; SCHAEFFER et al., 1966, 1967 sowie SCHAEFFER, 1970). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Zellkulturen zum biologischen Nachweis von SEB eingesetzt. Die Verfahren der Zellkulturtechnik wurden aus MAYR et al. (1974) entnommen.

Unter mehreren verschiedenen Zellkulturen wurde im ersten Versuchsabschnitt nach einer Kultur für Reihentests mit behandeltem und unbehandeltem SEB gesucht, die ohne Zusätze biologisch wirksamer Substanzen und ohne aufwendige physikalische Vorbehandlung einen optisch leicht erfaßbaren SEB-bedingten cytopathogenen bzw. cytociden Effekt zeigt. Als dafür notwendige Voraussetzung erwies sich konstante, zügige Vermehrung der Zellen, bis auf der Bodenfläche des Teströhrchens ein geschlossener Zellrasen entstanden ist. Übereinanderwachsen und Kolonienbildung erschweren die Auswertung. Die Morphologie der Zellen sollte einheitlich sein und sich nicht innerhalb weniger Passagen ändern. Der CPE sollte bei allen SEB-Proben gleichartig sein, nach möglichst kurzer Inkubationszeit auftreten und klar erkennbar sein. Von Bedeutung ist auch ein Auftreten des CPE bei möglichst niedriger SEB-Dosis. Kontaminierte Kulturen eignen sich selbstverständlich nicht zu Versuchen, auf bakterielle und mykologische Besiedlung wurde regelmäßig mit Hilfe verschiedener Nährböden geprüft. Bei Verdacht auf Kontamination durch Viren oder Mykoplasmen wurden die entsprechenden Kulturen vernichtet, der Versuch einer Identifikation der Keime wurde nicht unternommen. Es wurde jedoch nicht als Aufgabe dieser Arbeit angesehen, ein SEB-Nachweissystem zu finden, das in Sensivität oder Spezifität den bekannten Verfahren zur Ermittlung der serologischen Aktivität überlegen wäre, vielmehr wurde die SEB-Dosierung nach der größtmöglichen Aussagekraft der Zellkulturversuche ausgerichtet.

Folgende acht Zellkulturen wurden unter Berücksichtigung der angegebenen Faktoren auf ihre Brauchbarkeit für biologische Tests mit SEB geprüft:

Permanente Zell-Linien:

Hep-2 (ATCC-CCL 23), Herkunft: menschliches Epidermoidkarzinom,
Morphologie: epitheloid.

HeLa (ATCC-CCL 2), Herkunft: menschliches Epithelkarzinom,
Morphologie: epitheloid.

MDCK (ATCC-CCL 34), Herkunft: Niere vom Hund, Morphologie:
epitheloid.

RK-13 (Flow), Herkunft: Fetale Kaninchenniere, Morphologie:
epitheloid.

75SD-G-376 (STAVROU et al., 1978), Herkunft: pleomorphes Misch-
gliom von der Ratte, Morphologie: epitheloid.

75SD-G-420 (STAVROU et al., 1978), Herkunft: pleomorphes Gliom
von der Ratte, Morphologie: fibroblastenähnlich.

Primärzellkulturen:

Lungenzellen, Herkunft: Lungenparenchym eines viermonatigen weib-
lichen Rinderfeten, Morphologie: fibroblastenähnlich.

Nierenzellen, Herkunft: Nierenparenchym eines viermonatigen weib-
lichen Rinderfeten, Morphologie: fibroblastenähnlich.

Als Basismedium wurden für die Anzucht der Zellkulturen bei Hep-2 und HeLa Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle Salzen (Mediapharm), bei den anderen Zellkulturen Tissue Culture Medium 199 (Difco) eingesetzt. Diese Medien wurden als wasserfreie Fertignährböden bezogen und nach Anweisung der Hersteller in Aqua dest. gelöst. Das gelöste Medium 199 wurde mit NaHCO_3 (Merck) auf pH 7,3 eingestellt und mit dem Druckfiltrationsgerät Selectron (Schleicher und Schüll) sterilfiltriert (Porengröße 0,2 μm). MEM wurde nach Auflösung autoklaviert (15 Min. bei 121 °C) und nach Erkalten mit steriler NaHCO_3 auf pH 7,3 eingestellt, außerdem wurde Phenolrot als Indikator zugegeben. Die Medien wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde die

jeweils erforderliche Menge an sterilem, fetalem Rinderserum -FBS- (Flow) zugesetzt, jeweils 5 % bei Hep-2 und HeLa, jeweils 8 % bei MDCK und RK-13 sowie jeweils 10 % bei den anderen Zellkulturen sowie 2 % L-Glutamin (Eurobio, Paris) bei Hep-2 als weiterer Zusatz. Außerdem wurde allen Medien pro Liter 0,2 g Streptomycin (Grünenthal), 200 000 IE Penicillin G (Höchst) sowie 5 mg Amphotericin B (Squibb) zugegeben. Die Zellkulturen wurden nach der Trypsinierung mit STV (Saline Trypsin Versene; Ablösung und Trennung der Zellen mit 5 ml 2 %iger Trypsin- und 2,5 ml Versene auf 100 ml phosphatgepufferte Kochsalzglukoselösung, pH 7,4) 1 : 4 bis 1 : 6 geteilt und in MA-Glasflaschen bzw. Kunststoffflaschen (Nunc) mit 80 bis 100 ml Medium angesetzt und bei 37 °C bis zum Dichtwachsen des Zellrasens inkubiert (ca. eine Woche). Primärkulturen wurden aus Rinderfeten wenige Stunden nach der Schlachtung gewonnen; die Isolierung und Anzüchtung der Zellen wurde nach MAYR et al. (1974) durchgeführt. Nach Dichtwachsen wurde auf gleiche Weise wie bei den Zelllinien verfahren. Es wurde erneut eine Trypsinierung vorgenommen und das Sediment in frischem Medium mit nur 5 % FBS so verdünnt, daß die Zellzahl bei $1,5$ bis 2×10^5 Zellen/ml lag. Die Zellenzahl wurde mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Ausbeute war unter gleichen Kultivierungsbedingungen bei Zelllinien, im Gegensatz zu Primärkulturen, stets gleich und brauchte daher nicht vor jedem Ansatz neu bestimmt zu werden.

Für die Prüfung der Zellkulturen hinsichtlich ihrer Reaktion auf einen Zusatz von SEB zum Medium wurde nicht nur natives, sondern aufgrund von mehreren Vorversuchen auch 20 Sek. auf 95 °C erhitztes SEB zugesetzt. Für einen Versuchsansatz wurden jeweils 18 Zellkulturröhrchen aus Kunststoff mit abgeflachtem Boden (Nunc) mit je 1 ml der Zellsuspension gefüllt. Dann wurden die behandelten oder nativen Toxinproben in Mengen von 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 bzw. 0,0125 ml in jeweils drei Röhrchen gegeben, drei Röhrchen blieben ohne Zusatz als Kontrolle. Die Zusätze entsprachen somit einem SEB-Gehalt von 200, 100, 50, 25 bzw. 12,5 mcg SEB pro ml (bei den erhitzten Proben: Ausgangskonzentration

vor der Erhitzung). Geringere SEB-Mengen als 12,5 mcg wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen, da sich diese Dosis im Vorversuch als die MAD (Minimum average dose) (FRIMMER, 1969) erwiesen hatte, mit der ein CPE erzeugt werden konnte. SEB-Zusätze von 400 mcg/ml und mehr wurden aufgrund von Vorversuchen ausgeschlossen, da die maximale Wirkung, nämlich die vollständige Auflösung der Zellen, bereits bei 200 mcg/ml eintrat. Daher wurde die obere SEB-Grenze auf 200 mcg SEB/ml festgelegt. Die Röhrchen wurden im Brutschrank unter Normalatmosphäre bei 37 °C bebrütet und täglich - erstmals nach 24 Stunden - unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung kontrolliert. Positive Reaktionen wurden registriert. Eine Woche nach dem Ansatz begannen auch bei den ungeschädigten Kulturen bzw. bei den Kontrollen allgemeine Degenerationserscheinungen (Ansäuerung des Mediums bei erschöpftem Puffer, Proteinmangel etc.), die Toxinwirkung zu überlagern oder zu verstärken, die letztmalige Auswertung des Ansatzes erfolgte daher am sechsten Tag nach dem Ansatz. Als positive Reaktion einer Konzentrationsstufe (CPE) wurde gewertet, wenn mindestens zwei von drei Röhrchen Zelldegeneration zeigten. Neben der sichtbaren Veränderung einer größeren Zahl von Zellen wurden ebenso eine niedrigere Zellenzahl pro Gesichtsfeld bzw. ein gänzlich Fehlen der Zellvermehrung gegenüber der Kontrolle registriert. Eine positive Reaktion war ebenfalls, wenn sich - gegenüber der Kontrolle - eine größere Zahl von Zellen abrundeten, sich von der Unterlage ablösten bzw. frei im Medium schwimmend vorgefunden wurden.

3.1.2. Ergebnisse

Eine Schädigung der Zellen nach der Inkubation mit SEB war bei allen Kulturen nach 24 bis 48 Stunden ablesbar. Bei den Zelllinien 75SD-G-420 und RK-13 trat nach 3 Tagen in den Röhrchen mit Toxindosen bis 100 mcg/ml eine Erholung der Zellen ein, die nach 5 Tagen durch eine, gegenüber der Kontrolle, beschleunigte Degeneration beendet wurde. Bei der Linie 75SD-G-376 bildete sich der CPE allmählich steigend aus und war nach 48 bis 72 Stunden voll entwickelt. Geschädigte Ansätze blieben bei der Zellvermehrung

rung zurück und bildeten typische Oberflächenveränderungen aus, der CPE "Wachstumshemmung" war für diese Kultur besonders kennzeichnend. Mit über 100 mcg/ml bebrütete Ansätze zeigten bei allen Kulturen starke irreversible Schädigungen, die nach 72 bis 96 Stunden zum vollständigen Absterben der Zellen führte, bei SEB empfindlichen Kulturen war dies bereits bei 100 mcg/ml zu beobachten. Eine Erhöhung des Serumanteils im Ansatzmedium von 5 auf 7 bis 10 % verstärkte die Erholungsphase, konnte aber die mit der Degeneration nach 5 Tagen verbundene Verkürzung der Lebensdauer der Zellen nicht beeinflussen. Es zeigte sich sogar, daß die erhöhte Wachstums- und Stoffwechselaktivität die Überlebenszeit noch verkürzten.

Bei der Untersuchung zeigte sich, daß zwar alle Zellkulturen durch den Zusatz von unerhitztem bzw. erhitztem SEB beeinflußt wurden, sich jedoch nicht nur im zeitlichen Ablauf der Reaktion und der MAD unterschieden, sondern auch in ihrer Reaktionsart (Tab. 1).

Hep-2 und HeLa wiesen zwar eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit auf, waren jedoch relativ unempfindlich gegenüber SEB. MDCK zeigte eine sehr differenzierte, plasmatische Reaktion in Form von Granulationen an der Zellperipherie, vakuolärer Degeneration und Lückenbildung im sonst dicht geschlossenen Zellrasen. Für die anschließend durchzuführenden Reihenversuche schied diese Zelllinie aber wegen ihres langsamen Wachstums aus; unter den Versuchsbedingungen kam es nämlich z. T. nicht zu einem völligen Schluß des Zellrasens, die Kultur stellte die Vermehrung nach Bildung von Zellinseln ein. Der Grund für den Wachstumsstopp lag - wie aus Parallelversuchen ersichtlich war - in dem niedrigen Serumzusatz von 5 % zum Zellkulturmedium, der gewählt wurde, um Interaktionen Rinderserum - SEB möglichst zu vermeiden. Für eine gezielte Untersuchung über die biologische Wirkung von SEB auf Säugetierzellen, bei der es nicht auf rasche Zellvermehrung für Reihenversuche ankommt, sondern z. B. biochemische Studien betrieben werden, sollte diese Zelllinie bei Voruntersuchungen berücksichtigt werden.

Die von der Firma FLOW LAB. angezüchtete und vertriebene Zelllinie RK-13 zeichnet sich wie MDCK durch einen lückenlos geschlossenen Zell-

Tabelle 1: Einfluß von unerhitztem bzw. erhitztem Enterotoxin B auf verschiedene Zellkulturen

Zellkultur	Wachstums- geschwindigkeit	MAD (mcg SEB/ml)	Reaktionsart
Hep-2	schnell	100 unerhitzt 50 kurzerhitzt	Wachstumshemmung
HeLa	schnell	50 unerhitzt 25 kurzerhitzt	Wachstumshemmung, vermehrt tote Zellen
MDCK	langsam	50 unerhitzt 12, 5 kurzerhitzt	Starke periphere Plasma- granulation, Wachstumshemmung
RK-13	mittel	50 unerhitzt 12, 5 kurzerhitzt	Wachstumshemmung, vakuoläre Degeneration
75SD-G 376	mittel	25 unerhitzt 12, 5 kurzerhitzt	Wachstumshemmung, Zell- degeneration
75SD-G-420	schnell	50 unerhitzt 12, 5 kurzerhitzt	Zelldegeneration, Schrumpfung, Lückenbildung
Kälberlunge	mittel	100 unerhitzt 50 kurzerhitzt	Träge Reaktion, vermehrt tote Zellen
Kälbernieren	mittel	100 unerhitzt 50 kurzerhitzt	Wachstumshemmung, verkürzte Lebensdauer

rasen aus. Negative Einflüsse wie Inkubation mit SEB, aber auch anderer Ursache wie mikrobiologische Kontamination oder überdehnnte Trypsinierung werden durch Lückenbildung, vakuoläre Degeneration und granuläre Einlagerungen im Plasma angezeigt. Die MAD für 20 Sek. bei 95 °C erhitztes SEB lag, wie bei MDCK, bei 12,5 mcg/ml, jene für unerhitztes SEB bei 50 mcg/ml.

Die beiden von experimentell erzeugten Gliomen bei Sprague-Dawley Ratten stammenden Zell-Linien 75SD-G-376 und 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1978) unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihrer Reaktion auf SEB.

Die aus Astrozyten mit vielen und langen Fortsätzen und aus kleineren Oligodendrozyten mit weniger und kürzeren Fortsätzen bestehende Zell-Linie 75SD-G-376 reagierte auf SEB-Zusätze mit starker Vermehrungshemmung, Rauigkeit der Zellmembran (plasmatischen Protrusionen) und bei höherer Dosierung (100 bis 200 mcg/ml) mit vollständigem Schrumpfen und Ablösung der Zellen (s. Bild 1 und 2).

Die wachstumsintensive Zell-Linie 75SD-G-420 besteht vorwiegend aus Zellen mit astrozytärem Erscheinungsbild und reagierte auf SEB-Zusätze mit Wachstumshemmung, Lückenbildung im sonst sehr dichten Zellrasen, Schrumpfung der Zellen, einer granuliert erscheinenden Oberfläche und leichter Ablösbarkeit der Zellen von der Unterlage (s. Bild 3 und 4).

Die Primärzellkulturen Kälberlunge und Kälberniere zeigten auch gegenüber dem erhitzten SEB eine hohe Stabilität. Von Versuch zu Versuch schwankende Reaktionsgrenzen, unterschiedliche Wachstumsintensität und der große Aufwand bei der immer wieder notwendigen Gewinnung und Anzucht und der damit verbundenen genetischen Inhomogenität des Zellmaterials machten die Primärzellkulturen für den Röhrchentest unbrauchbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine besondere Eignung für Zellkulturtests mit SEB bei den Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420 und RK-13 besteht.

Aufnahmen mit Phasenkontrast, Objektiv 10-fach vergrößernd. Zellen
in situ im Teströhrchen mit abgeflachtem Boden.

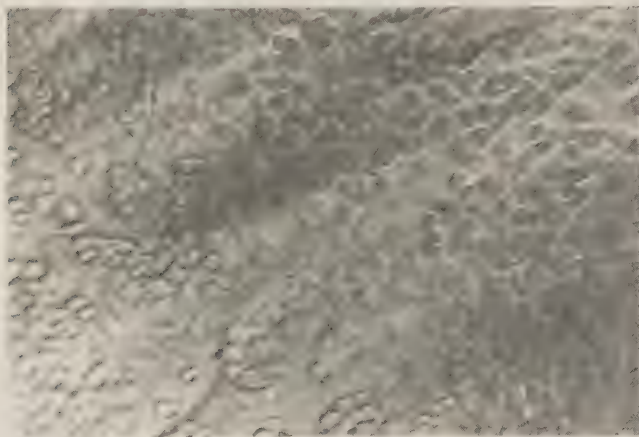


Bild 1: Zellkultur 75SD-G-376 - 48 Stunden Bebrütung ohne Toxinzusatz



Bild 2: Zellkultur 75SD-G-376 - 48 Stunden Bebrütung mit 100 mcg SEB/ml
im Medium

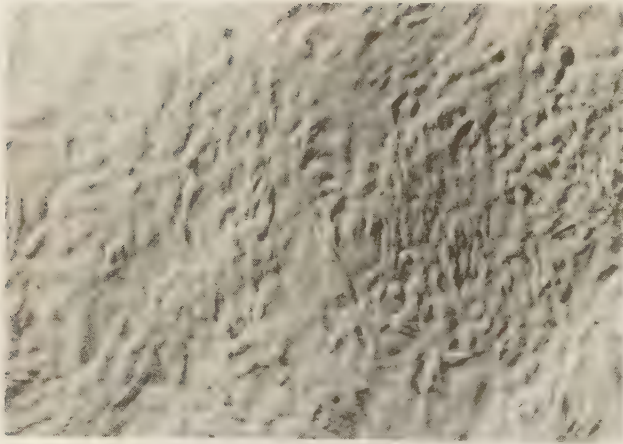


Bild 3: Zellkultur 75SD-G-420 - 48 Stunden Bebrütung ohne Toxinzusatz

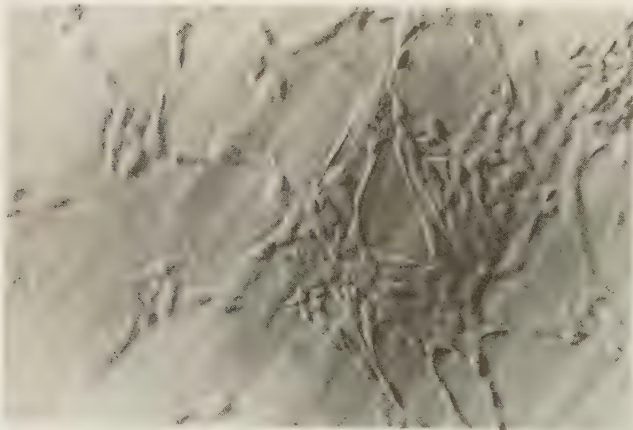


Bild 4: Zellkultur 75SD-G-420 - 48 Stunden Bebrütung mit 100 mcg SEB/ml
im Medium

3.2. Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die biologische und serologische Aktivität von SEB

3.2.1. Material und Methodik

3.2.1.1. SEB

Bei dem im nativen Zustand eingesetzten SEB handelte es sich um das bereits im Rahmen der Versuche des ersten Abschnittes beschriebene Produkt (s. 3.1.1.1.). Auf die behandelten SEB-Proben wird im einzelnen später eingegangen (s. 3.2.2.).

3.2.1.2. Zellkulturen

Aufgrund der im ersten Hauptabschnitt der eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse (3.1.2.) wurden diese Reihenversuche mit der Zelllinie 75SD-G-420 durchgeführt. Zusätzlich lief bei den Versuchen zum Einfluß physikalischer Faktoren auf die biologische Aktivität von SEB die Zelllinie RK-13 mit, bei den Versuchen zum Einfluß chemischer Faktoren die Zelllinie 75SD-G-376, d.h. die parallel angesetzten SEB-Proben bei der Inaktivierung wurden auf zwei Zellkulturen getestet. Die Untersuchungen selbst liefen in gleicher Art und Weise wie im ersten Hauptabschnitt ab (s. 3.1.1.2.).

3.2.1.3. Radiale Immunodiffusion

Der Nachweis der serologischen Aktivität von SEB erfolgt meist im Gel-diffusionstest (Übersicht bei SOMMERFELD und TERPLAN, 1975), der eine qualitative (z.B. OUCHTERLONY, 1948; WADSWORTH, 1957; CROWLE, 1958) oder quantitative (z.B. OUDIN, 1952; MANCINI et al., 1965) Aussage ermöglicht. Entscheidend ist bei diesen Verfahren die Reaktion des Antigens mit spezifischen Antikörpern und die Bildung von Präzipitaten. Bei chemischer oder physikalischer Behandlung des SEB ist es jedoch vorstellbar, daß die Toxinmoleküle ihre Bindungsfähigkeit mit dem spezifischen Antikörper ganz oder teilweise verlieren, ohne daß die biologische Aktivität in gleichem Umfang abnehmen muß. Um festzustellen, ob und inwieweit eine

Beziehung zwischen biologischer und serologischer Aktivität auch bei behandeltem SEB gegeben ist, wurden die SEB-Proben mit der einfachen radialen Immunodiffusion nach MANCINI et al. (1965) ausgetestet, die eine relativ gute Quantifizierung erlaubt.

Zu diesem Zweck wurde 1 g Agarose (Litex) in 100 ml Barbitalpuffer (3,7 g Barbitursäure und 4,1 g Barbitalnatrium in 1000 ml Aqua dest.) gelöst (pH 8,4), im Dampftopf erhitzt und in abgemessenen Portionen (7,25 ml) bei 4 °C aufbewahrt. Für die Beschichtung eines Objektträgers von 7,5 x 5,2 cm, der in einen Kunststoffrahmen auf dem Nivelliertisch eingelegt wurde, wurden 7,25 ml benötigt. Vor dem Ausgießen der gelösten Agarose wurden 0,25 ml Antiserum B zugegeben. Die Temperatur der Agarose sollte 58 °C beim Mischen nicht überschreiten, da sonst ein Aktivitätsverlust des Antiserums auftritt. Nach kräftigem Durchmischen (Rüttler) wurde die Agarose unverzüglich ausgegossen. Die beschichteten Objektträger können bei 4 °C in der feuchten Kammer maximal 5 Tage aufbewahrt werden, da danach eine Schichtdickenverminderung des Gels infolge Ausschwitzen von Wasser auftritt.

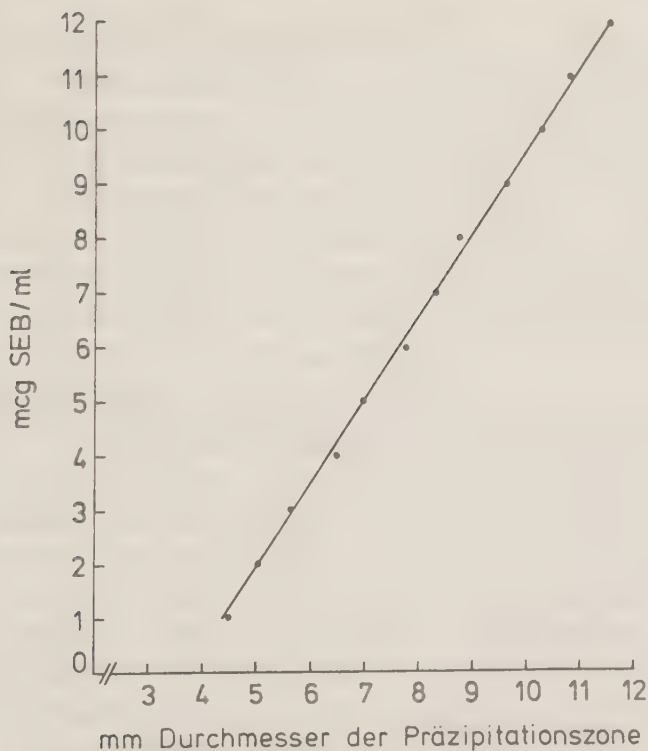
Zum Gebrauch wurden ca. 20 Löcher mit 3,0 mm Durchmesser ausgestanzt und mit je 7 µl Probe gefüllt. Die Platten wurden dann in der feuchten Kammer auf dem Nivelliertisch 48 Stunden bei 20 °C inkubiert, danach im Trockenschrank unter Fließpapier getrocknet, mit Coomassie-Brillant-Blau vier Min. lang gefärbt (5 g Coomassie-Brillant-Blau, (Serva), 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig und 450 ml Aqua dest.) und anschließend in einer Mischung aus 250 ml Methanol, 100 ml Eisessig und 450 ml Aqua dest. bei 50 °C entfärbt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden von dem SEB-Pool, dessen Toxin-gehalt bekannt war, parallele Verdünnungsreihen von 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 mcg/ml mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und die Durchmesser der Präzipitate bei den einzelnen SEB-Konzentrationen ausgemessen. Dabei ergab sich eine lineare Proportionalität im Bereich von 1 bis 12 mcg/ml (s. Abb. 1).

Die Inaktivierungsversuche wurden ausschließlich mit 1000 mcg SEB/ml gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH 6,8) vorgenommen. Zur Bestimmung des SEB-Gehaltes in den behandelten Proben wurden quadratische Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und im MANCINI-Test angesetzt. Bei der Auswertung wurden die Konzentrationsstufen, deren Präzipitationsdurchmesser im Bereich der Eichkurven lagen, zur Berechnung der Restaktivität in Prozent herangezogen.

Abbildung 1:

Eichkurve zur Bestimmung des Gehaltes an Enterotoxin mit dem MANCINI-Test



3.2.2. Versuchsanordnung und Ergebnisse

3.2.2.1. Physikalische Faktoren

3.2.2.1.1. Erhitzung

Das SEB wurde in druckfest verschlossenen Reagenzröhrchen in der für einen Zellkulturanatz und serologischen Test benötigten Menge von 1,5 ml im Wasserbad erhitzt. Als Anheizzeit von 20 °C auf 99 °C unter Schütteln wurden 40 Sek. ermittelt, bei den angegebenen Erhitzungszeiten ist diese Zeit nicht berücksichtigt. Von jeder Erhitzungsstufe wurden Parallelproben angefertigt. Folgende Erhitzungsstufen (Temperatur/Zeit) wurden gewählt: 75 °C/15 Min., 85 °C/15 Min., 95 °C/5, 15 Min. bzw. 20 Sek., 99 °C (Siedetemperatur)/20 Sek. bzw. 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 bzw. 210 Min. Nach der Erhitzung wurden die Probenröhrchen im Wasserstrahl abgekühlt.

Bei der Wärmebehandlung kam es zu optisch wahrnehmbaren Veränderungen des SEB. Bei 70 °C trat eine milchige Trübung der Lösung auf, die bei weiterer Erhitzung und Temperaturanstieg auf 95 °C Flocken bildete. Nach Erkalten und bei erschütterungsfreier Lagerung setzten sich die weißen Flocken am Boden des Reagenzröhrchens ab, der Überstand wurde klar. Dieser Niederschlag war auflösbar durch Ansäuerung mit 1 n HCl auf Werte unter pH 3,5 bzw. Alkalisierung mit 1 n NaOH auf Werte über pH 12,8. Im MANCINI-Test zeigten derart behandelte Toxinproben jedoch selbst nach Neutralisation atypische, verwaschene, nicht auswertbare Präzipitate.

Bei der Bestimmung der serologischen Aktivität des erhitzten SEB (1000 mcg/ml), das vor der Probenentnahme zum serologischen Test intensiv mit dem Rüttler durchmischt wurde, ergab sich, daß die Inaktivierung bei 85 °C und bei 95 °C etwas stärker war als bei 75 °C einerseits und bei Siedetemperatur (99 °C) andererseits und außerdem der Inaktivierungsgrad von der Erhitzungsdauer abhängig war (Tab. 2). Bei der Ermittlung der MAD (die geringste der geprüften SEB-Konzentrationen, die noch einen CPE bewirkte) war festzustellen, daß für 15 Min. bei 75, 85, 95, bzw. 99 °C erhitztes SEB mit 25 mcg/ml bzw. 50 mcg/ml Werte registriert wurden, die jenen für das native SEB (50 mcg/ml) entsprachen oder nur um eine Stufe davon abwichen (Tab. 2). Während bei Verkürzung der Erhitzungszeit auf 5 Min.

Tabelle 2: Einfluß von Erhitzungstemperatur und -zeit auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Temperatur °C	t	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
Kontrolle		100	50
75	15 Min.	5	25
85	15 Min.	0	50
95	20 Sek.	10	12, 5
95	5 Min.	7	25
95	15 Min.	0	25
99	20 Sek.	14	12, 5
99	5 Min.	14	25
99	15 Min.	7	50
99	30 Min.	8	100
99	60 Min.	6	200
99	90 Min.	7	200
99	120 Min.	0	-
99	150 Min.	0	-
99	180 Min.	0	-
99	210 Min.	0	-

ähnliche Werte ermittelt wurden, gelang es bei nur 20 Sek. dauernder Erhitzung (95 bzw. 99 °C) sogar mit der Probe, die 12,5 mcg SEB enthalten hatte, den typischen CPE auszulösen. Mit über 15 Min. zunehmender Erhitzungsdauer (99 °C) stieg die MAD stetig an, bis bei 120 Min. erhitztem SEB kein Effekt mehr mit der höchsten getesteten Konzentration beobachtet werden konnte. Es zeigte sich bei diesen, über längere Zeit erhitzten Proben sogar, daß die Zellen die denaturierten Toxinflocken als Wachstumsunterlage benutzten und überwucherten.

3.2.2.1.2. Ultraschallbehandlung

Je zwei Toxinproben wurden unerhitzt und nach 5- bzw. 30minütigem Erhitzen auf 99 °C einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Beschallung erfolgte in Reagenzröhrchen (1,5 ml SEB) bei 20 °C mit der Mikrospritze (3 mm Durchmesser) des Ultraschall Desintegrators Branson Sonifier B 12 für 3 Min. auf Leistungsstufe 4, die einer elektrischen Leistung von 40 W entspricht.

Es zeigte sich bei diesen Versuchen (Tab. 3), daß die serologische Aktivität des SEB (1000 mcg/ml) bei den unerhitzten Proben nicht beeinflusst wurde. Bei den zuvor erhitzten Proben war zwar eine deutliche Abnahme der Aktivität zu registrieren, doch war diese mit 70 % (5 Min.) bzw. 74 % (30 Min.) deutlich geringer als die bei erhitzten Proben, die nicht anschließend beschallt worden waren (86 % bzw. 92 %; s. Tab. 2). Die biologische Aktivität wurde durch die Beschallung bei der unerhitzten und bei der 30 Min. erhitzten Probe gegenüber unbeschallten Proben mit gleicher Vorbehandlung (unerhitzt bzw. 30 Min. erhitzt; vgl. Tab. 2) nicht verändert, bei der 5 Min. erhitzten nur um eine Reaktionsstufe (12,5 statt 25; vgl. Tab. 2).

3.2.2.1.3. Infrarotbestrahlung

Die Wirkung der Infrarotbestrahlung von SEB wurde mittels einer handelsüblichen Infrarotlampe (Theratherm 250 Watt, Osram) geprüft. Die Toxinlösung (jeweils 3 ml) wurde in Petrischalen gegeben, die zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten mit Kunststoffhaftfolie (Melitta) überspannt wurden; um eine Erwärmung der Schalen über 45 °C zu verhindern, wurde ein Abstand zum Objekt von 50 cm gewählt. Die Petrischalen wurden in einem abgedunkelten Raum 11, 14, 18 bzw. 36 Stunden von oben bestrahlt.

Tabelle 3: Einfluß der Ultraschallbehandlung auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Vorbehandlung (Erhitzung)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
keine	100	50
5 Min. 99 °C	30	12, 5
30 Min. 99 °C	26	100
Kontrolle (unerhitzt)	100	50

Tabelle 4: Einfluß der Infrarotbestrahlung auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Bestrahlungszeit (Std.)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
11	95	12, 5
14	98	12, 5
18	96	25
36	90	25
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12, 5

Das für den biologischen Nachweis benötigte Material wurde vor der eigentlichen Versuchsdurchführung noch 20 Sek. auf 95 °C erhitzt, um den wirkungssteigernden Effekt auszunützen (s. 3.1.2.) und einen möglichen Einfluß besser beurteilen zu können. Die Versuche erbrachten selbst nach einer Bestrahlungsdauer von 36 Stunden keine optische Veränderung der SEB-Proben (1000 mcg/ml) und keinen signifikanten Verlust der serologischen Aktivität (Tab. 4). Die für die Auslösung des CPE erforderlichen SEB-Konzentrationen entsprachen bei den 11 bzw. 14 Stunden bestrahlten Proben der bei der 20 Sek. auf 95 °C erhitzten, nicht IR-bestrahlten Kontrolle, nach 18 bzw. 36 Stunden war die nächsthöhere geprüfte SEB-Konzentration die hierfür erforderliche Mindestdosis.

3.2.2.1.4. Ultraviolette Bestrahlung

Der Einfluß der ultravioletten Strahlen auf SEB wurde in einer Versuchsreihe mit einer UV-Röhre Hanau, Typ 5136, 50 Hz, 30 W als Strahlenquelle geprüft. Das SEB wurde in Quarzglasröhrchen mit einer Wanddicke von 1,3 mm und einem Innendurchmesser von 7,85 mm in Mengen von 1,5 ml bei 20 °C bestrahlt. Die Röhrchen wurden im Abstand von 25 cm von der Leuchtröhre an einem Gestell befestigt und folgende Zeiten bestrahlt: 5, 15, 30, 60 bzw. 120 Min.; 3, 4, 5, 12, 24, 48 bzw. 72 Stunden.

Die UV-Bestrahlung bewirkte bei allen SEB-Proben, die vier und mehr Stunden bestrahlt wurden, einen elfenbeinfarbenen Niederschlag in den Quarzglasröhrchen, der in der Menge an den Niederschlag nach Erhitzung erinnerte. Er wies allerdings einen gelblicheren Farbton auf und war in seiner Beschaffenheit zäher, d.h. nicht mehr durch einfaches Schütteln in dem Überstand suspendierbar. Auffallend war weiterhin ein intensiver Mäusegeruch der Toxinprobe nach etwa zehnstündiger Bestrahlung. Serologische und biologische Aktivität (die für den Zellkulturtest erforderlichen Proben wurden kurzerhitzt wie in 3.2.2.1.3.) fielen kontinuierlich ab und waren nach 12 Stunden nicht mehr nachweisbar (Tab. 5). Nach 48 bzw. 72 Stunden Bestrahlung zeigten die Proben allerdings wieder eine geringe Zytotoxizität.

Tabelle 5: Einfluß von ultravioletter Bestrahlung auf die serologische
 und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Bestrahlungszeit (Min. bzw. Std.)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
5 Min.	96	12,5
15 "	50	25
30 "	40	50
60 "	28	50
120 "	25	100
180 "	15	100
240 "	8	200
300 "	4	200
12 Std.	0	-
24 "	0	-
48 "	0	200
72 "	0	200
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12,5

3.2.2.2. Chemische Faktoren

Bei den zur Prüfung eines Einflusses auf die Aktivität von SEB verwendeten Mitteln handelt es sich um: Formaldehyd 35 %, pH 3,3 (Merck); Chloramin T, Trockensubstanz mit einem Aktivchlorgehalt von 150 000 ppm (Merck); Natriumhypochloritlösung mit einem Aktivchlorgehalt von 150 000 ppm, pH 9,8 (Merck); Peressigsäure 40 %, pH 3,2 (Peroxid Chemie) bzw. Wasserstoffperoxid 30 %, pH 3,2 (Merck).

Die chemischen Inaktivierungsmittel wurden in den Konzentrationen geprüft, in denen sie üblicherweise als Desinfektionsmittel eingesetzt werden. Außerdem wurde versucht, die Grenzkonzentration des Desinfektionsmittels zu ermitteln, die noch zur vollständigen Inaktivierung von SEB erforderlich ist. Dabei diente die Arbeit von HELBER (1977) als Orientierung. Die Reaktionsprodukte aus den Versuchen 3.2.2.2.1. bis 3.2.2.2.5. wurden nach Abzweigung von 0,2 ml für den MANCINI-Test bzw. Redoxtest für 20 Sek. auf 95 °C erhitzt und bei 4 °C bis zum Einsatz im Zellkulturtest gelagert. Der Redoxtest wurde auf folgende Weise durchgeführt: 0,1 ml behandelte SEB-Lösung + 0,4 ml Aqua dest. + ein Körnchen Kaliumjodid + ein Tropfen Stärkelösung. Bei positivem Ausfall (vorhandenes Redoxpotential) weist diese Mischung eine tiefblaue Farbe auf. Ein solches Ergebnis wurde nur bei Chloramin T registriert. Der Nachweis auf Formaldehyd im Dialysat mit Schiff's Reagenz in Versuch 3.2.2.2.5. war ebenfalls negativ.

3.2.2.2.1. Peressigsäure

In sterilen Reagenzröhrchen wurden je 1,5 ml SEB mit Peressigsäure (PES) auf einen Gehalt von 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 bzw. 0,5 % PES eingestellt. Von allen Reaktionsstufen wurden Parallelproben angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 20 °C, pH 3,3, wurden die Proben - um Reste des PES zu entfernen - in Dialysierschläuche (Union Carbide Corp.) gefüllt und dreimal hintereinander gegen 1,2 l phys. Kochsalzlösung bei 20 °C dialysiert. Die Zeitdauer der Dialyse betrug 4 Stunden.

Volumenkontrollen nach der Dialyse zeigten geringe Verluste von 0,03 ml. Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich dabei um im Dialyserschlauch zurückgebliebene Benetzungsverluste handelt.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen war bei einer PES-Konzentration von 0,3 % weder eine serologische noch eine biologische Restaktivität mehr zu ermitteln (Tab. 6). Auch bei den niedrigeren geprüften Konzentrationen war innerhalb von 30 Min. bereits eine Aktivitätsabnahme zu registrieren.

3.2.2.2.2. Wasserstoffperoxid

In Reagenzröhrchen wurden Parallelansätze von je 1,5 ml SEB auf einen Endgehalt von 1, 2, 3, 5, 10 bzw. 14 % H_2O_2 (pH 3,5) eingestellt. Nach der Inkubationszeit von 60 Min. bei 20 °C wurde wie bei 3.2.2.2.1. beschrieben dialysiert. Da die relativ hohen H_2O_2 -Konzentrationen in der Probe (ausgehend von einer 30 %igen Stammkonzentration) eine erhebliche Volumenzunahme bedingten, wurden alle Proben nach der Dialyse lyophilisiert und mit Aqua dest. wieder auf das Ausgangsvolumen von 1,5 ml eingestellt.

Nach der Inkubation des SEB mit Wasserstoffperoxid trat keine sichtbare Veränderung in der Toxinlösung auf, auch eine mögliche Bildung von Gasbläschen war nicht zu beobachten. Die serologische Aktivität nahm bei steigendem H_2O_2 -Gehalt nur allmählich ab und war auch bei der höchsten geprüften Konzentration noch zu etwas mehr als 20 % vorhanden (Tab. 7). Die biologische Aktivität war demgegenüber bei einem H_2O_2 -Gehalt von 10 % nicht mehr nachweisbar. Die bereits stark oxidierend wirkenden niedrigen Konzentrationen vermochten nicht innerhalb der gegebenen Zeit das SEB vollständig zu detoxifizieren. Ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle war erst ab 3 % H_2O_2 gegeben.

3.2.2.2.3. Natriumhypochlorit

Je zwei SEB-Proben zu 1,5 ml wurden mit 75 000 ppm aktives Chlor enthaltender Natriumhypochloritlösung (NaOCl) so vermischt, daß End-

Tabelle 6: Einfluß von Peressigsäure auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Inkubationszeit: 30 Minuten		
PES-Konzentration (%)	Serologische Restaktivität (%)	MAD (mcg/ml)
0,05	85	50
0,1	55	100
0,2	49	200
0,3	0	-
0,5	0	-
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12,5

Tabelle 7: Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Inkubationszeit: 60 Minuten		
H ₂ O ₂ -Konzentration (%)	Serologische Restaktivität (%)	MAD (mcg/ml)
1	80	25
2	78	25
3	72	50
5	67	100
10	33	-
14	22	-
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12,5

konzentrationen von 1500, 750, 500, 250, 100 bzw. 50 ppm gegeben waren (pH 6,8). Nach 60 Min. Inkubation bei 20 °C wurden Reste des NaOCl durch Dialyse entfernt (wie in 3.2.2.2.1.).

Bei den schwächeren Konzentrationen war eine milchige Trübung der Proben zu beobachten, bei den Proben mit mindestens 500 ppm freies Chlor eine Gelbfärbung ohne Trübung. Außerdem wurde bei den letztgenannten Konzentrationen das SEB bei der sich im Hinblick auf den biologischen Test anschließenden Erhitzung (20 Sek. bei 95 °C) nicht ausgefällt. Ab einer Konzentration von 500 ppm freies Chlor war keine serologische Restaktivität mehr gegeben (Tab. 8), bei 250 ppm betrug sie auch nur noch ca. ein Drittel der ursprünglichen SEB-Aktivität. Die biologische Aktivität war bei 50 ppm freies Chlor bereits deutlich gegenüber der Kontrolle erniedrigt und ab 100 ppm nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 8: Einfluß von Natriumhypochlorit auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Inkubationszeit: 60 Minuten		
NaOCl-Konzentration (ppm freies Chlor)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
1500	0	-
750	0	-
500	0	-
250	33 (verwaschene Präzipitate)	-
100	60	-
50	72	100
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12, 5

3.2.2.2.4. Chloramin T

SEB-Proben zu 1, 5 ml wurden mit frisch angesetzter Chloramin T (CT)-Lösung auf 3000, 1500, 750, 500, 250, 100 bzw. 50 ppm freies Chlor eingestellt (pH 6,8) und, da der Zeitfaktor hier eine größere Rolle spielt, 120 Min. bei 20 °C inkubiert. Die sich anschließende Dialyse wurde aufgrund der Ergebnisse des Redoxtests bei CT in abgeänderter Form durchgeführt: Zweimal gegen je 1, 2 l physiologische Kochsalzlösung (180 Min.), einmal (90 Min.) gegen 1, 2 l Aqua dest. und noch einmal (90 Min.) gegen 1, 2 l physiologische Kochsalzlösung. Das Volumen wurde kontrolliert.

Die optisch feststellbaren Veränderungen der mit CT inkubierten SEB-Proben entsprachen den bereits bei NaOCl beschriebenen. Auffällig war, daß die Probe mit Kaliumjodid und Stärke auf noch vorhandenes Redoxpotential trotz häufigerer Dialyse im Gegensatz zur mit NaOCl inkubierten SEB-Probe positiv ausfiel. Die serologische Aktivität des SEB war bereits bei 50 ppm freies Chlor um mehr als 50 % herabgesetzt und bei den höheren Konzentrationen nicht mehr nachweisbar. Die biologische Wirksamkeit des SEB war ebenfalls bereits bei niedrigen CT-Konzentrationen (50 ppm freies Chlor) aufgehoben. Allerdings war bei 250 ppm freies Chlor wieder eine geringe Zytotoxizität feststellbar, die dann mit steigenden CT-Konzentrationen zunahm (Tab. 9).

Zur Prüfung, ob nicht-dialysierte Rückstände des Chloramin T für diese sekundäre Zytotoxizität verantwortlich sind, wurde CT in physiologischer Kochsalzlösung (100 ppm freies Chlor/ml) ohne Enterotoxin B und ohne Dialyse Zellkulturansätzen (Röhrchen) in Mengen von 0,1, 0,2 bzw. 0,3 ml zugesetzt. Weiterhin wurde eine physiologische Kochsalzlösung mit der hohen CT-Konzentration von 15000 ppm freies Chlor wie die Enterotoxinproben dialysiert und in Mengen von 0,1, 0,2 bzw. 0,3 ml Zellkultur-röhrchen zugegeben. Es konnte jedoch keine von CT allein ausgehende Zellschädigung bei diesen Ansätzen festgestellt werden.

Tabelle 9: Einfluß von Chloramin T auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Inkubationszeit: 120 Minuten		
CT-Konzentration (ppm freies Chlor)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
3000	0	25
1500	0	25
750	0	50
500	0	100
250	Unscharf begrenzte	200
100	Präzipitate	-
50	45	-
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)	n. d.	12,5

Tabelle 10: Einfluß von Formaldehyd auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B

Formaldehyd- konzentr. (%)	Inkubationszeit (Tage)	Serologische Rest- aktivität (%)	MAD (mcg/ml)
1	2	100	50
3	2	76	200
5	2	76	100
5	5	65	25
Kontrolle (20 Sek. bei 95 °C)		n. d.	12,5

3.2.2.2.5. Formaldehyd

Parallelproben mit je 1,5 ml SEB wurden mit 35 %igem Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 1 %, 3 % bzw. 5 % eingestellt und 48 Stunden bei 20 °C inkubiert, Proben mit 5 % Formaldehyd zusätzlich für 5 Tage. Dann erfolgte die Dialyse, Gefriertrocknung und Einstellung auf das Ausgangsvolumen mit Aqua dest. in der beschriebenen Art und Weise.

Enterotoxin B erwies sich als sehr stabil gegenüber Formaldehyd (Tab. 10). Die serologische Aktivität war bei 1 % Formaldehyd nach 48 Stunden noch unverändert und betrug bei 3 bzw. 5 % Formaldehyd immer noch mehr als 75 %. Durch Verlängerung der Inkubationszeit um drei Tage war ein weiterer Aktivitätsabfall um ca. 10 % zu erzielen. Die biologische Aktivität des SEB verminderte sich zwar deutlich bei 48stündiger Einwirkung des Formaldehyds, war aber nach fünftägiger Inkubation nur um eine Stufe niedriger als bei der Kontrolle.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die biologische Aktivität der Staphylokokken-Enterotoxine (SE) wurde von vielen Untersuchern durch Fütterung von Resten verdächtiger Lebensmittel oder Staphylokokken-Kulturfiltraten an Versuchstiere verschiedener Gattungen, vorwiegend Affen und Katzen, nachgewiesen. Außerdem wurden die zu testenden Proben häufig auch parenteral, insbesondere intravenös oder intraperitoneal, an Versuchstiere verabreicht. Auf diese verschiedenen biologischen Nachweisverfahren und ihre Problematik wurde bereits des öfteren eingegangen, zuletzt im deutschen Schrifttum von GANTZE (1976).

Die Grundlagenforschung zum Wirkungsmechanismus des Enterotoxins, die in den 60iger Jahren insbesondere von den Arbeitsgruppen um SUGIYAMA bzw. KENT betrieben wurde, erbrachte, daß der primäre Angriffspunkt für die emetische Wirkung von SE in den Bauchorganen liegt (SUGIYAMA und HAYAMA, 1965) und daß es zu erheblichen pathologisch-anatomischen Veränderungen im Magen-Darmtrakt, insbesondere im Jejunum kommt (KENT, 1966; KENT et al., 1966; SHEAHAN et al., 1970). Histopathologische Untersuchungen ergaben, daß dabei insbesondere die Mitochondrien des Darmepithels und der Tunica propria geschädigt werden (MERRILL und SPRINZ, 1968), es aber innerhalb kurzer Zeit zu einer Regeneration kommt. Über eine Schädigung anderer Organe nach oraler Verabfolgung von SE liegen in der Literatur keine Hinweise vor. Nach intravenöser Applikation wird das Enterotoxin schnell aus dem Blutkreislauf entfernt (CRAWLEY et al., 1966 a; RAPOPORT et al., 1966; MORRIS et al., 1967). In der Niere dagegen (MORRIS et al., 1967; RAPOPORT et al., 1967; NORMANN et al., 1969; STAAB et al., 1969) kann es gespeichert werden. Auch Leber und Lunge sowie der Magen-Darmtrakt scheinen an der Entfernung des Enterotoxin aus dem Kreislauf beteiligt zu sein, während andere Organe keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen (BERGDOLL, 1970; MINOR und MARTH, 1976). Im Rahmen der langfristigen Studien über die Wirkung von SE entstand auch die Frage nach einem möglichen spezifischen Effekt

auf Zellkulturen (KIENITZ und SCHMELTER, 1964). Dabei wurden z. T. widersprechende Ergebnisse erzielt: Während MILONE (1962), KIENITZ und SCHMELTER (1964) sowie HALLANDER und BENGTSSON (1967) aufgrund ihrer Untersuchungen glaubten, daß SE mit Zellkulturen nicht nachweisbar ist, kamen GUERIN et al. (1962), SCHAEFFER et al. (1966 und 1967), GRIGOROVA und DANON (1968), URBACH et al. (1968), SCHAEFFER (1970), RAKAROWA et al. (1971), DE WAART et al. (1972) sowie TERPLAN und ZAADHOF (1976) zu positiven Resultaten. SCHAEFFER (1970) empfahl jedoch, Zellkulturen aufgrund der vielen variablen Faktoren weniger als Nachweissystem von ungereinigtem SE (insbesondere aus Lebensmitteln) einzusetzen, als vielmehr als Modell zum Studium der biologischen Aktivität von SE.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von gereinigtem SEB auf Zellkulturen unterschiedlicher Herkunft geprüft und die Interaktion "SEB-Zellkulturen" unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden. Dabei sollte weniger Wert auf eine, den serologischen Tests vergleichbare Nachweisgrenze gelegt werden, als vielmehr auf eine sichere Abgrenzung positiver und negativer Befunde. Für diesen Zweck wurden sowohl solche Zell-Linien eingesetzt, deren Anwendung für den Nachweis von SE bereits von anderen Autoren beschrieben wurde, wie HeLa (MILONE, 1962; HALLANDER und BENGTSSON, 1967; SCHAEFFER, 1970; RAKAROWA et al., 1971; URBACH et al., 1968; DE WAART et al., 1972; TERPLAN und ZAADHOF, 1976), als auch solche Zell-Linien, deren Eignung für den SE-Nachweis noch nicht geprüft wurde, wie RK-13 (Flow Lab.), MDCK (ATCC-CCL 34), 75SD-G-376 und 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1978). Außerdem wurden auch Primärzellkulturen getestet, und zwar fetale Lungenzellen bzw. fetale Nierenzellen vom Rind. Als Enterotoxin wurde im Institut hergestelltes, in Anlehnung an SCHANTZ et al. (1965) gereinigtes SEB verwendet, das frei war von Hämolsinen und Thermonuklease und im OUCHTERLONY-Test mit dem spezifischen Antiserum nur eine Präzipitationslinie bildete. Der Gebrauch eines gereinigten SE-Präparates ist für Zell-

kulturversuche insofern von großer Bedeutung, als auch andere Staphylokokkenstoffwechselprodukte, insbesondere Hämolsine und Thernonuklease (HALLANDER und BENGTTSSON, 1967) schädigende Effekte auf Zellkulturen ausüben können. Daher läßt sich bei Versuchen mit Rohenterotoxin nicht mit Sicherheit abgrenzen, ob die cytophatischen Effekte (CPE) durch das Enterotoxin oder andere Wirkstoffe ausgelöst wurden. Zwar wurden die Rohenterotoxine von den meisten Autoren vor Ansatz im Zellkulturtest im Hinblick auf die Ausschaltung thermolabiler Stoffwechselprodukte auf 80 bis 100 °C erhitzt bzw. mit Ascorbinsäure versetzt (RAKAROWA et al., 1971), doch sind - wie in eigenen Versuchen beobachtet werden konnte - auch in diesen Fällen unspezifische Wirkungen (z. B. durch die hitzestabile Thernonuklease) nicht auszuschließen. Methodisch wurde in Anlehnung an TERPLAN und ZAADHOF (1976) so vorgegangen, daß SEB den Zellkulturen sofort nach der Teilung und Abfüllung in Test-Röhrchen zugegeben wurde und nicht - wie bei den anderen Untersuchungen - erst nach dem Dichtwachsen des Zellrasens in den Test-Röhrchen. Auf diese Weise ließ sich nicht nur der Nachweis beschleunigen, sondern auch die Nachweisgrenze senken. Offensichtlich ist nämlich die Sensitivität der Zellen gegenüber SEB gleich nach Zellteilung und im Zustand der verstärkten Proteinsynthese größer als nach Auswachsen zu einem dichten Rasen. Diese Beobachtung widerspricht der Feststellung von SCHAEFFER et al. (1966 und 1967), die bei menschlichen embryonalen Jejunum- und Ileumzellen von einer bis zu 48 Stunden nach der Teilung mit Trypsin anhaltenden Resistenz gegenüber 100 mcg SEB/ml berichteten. Auch die von SCHAEFFER et al. (1966) sowie SCHAEFFER (1970) erwähnte SEB-Resistenz von Säuger-Zellkulturen bei Zusatz von Kälberserum zum Medium konnte in den eigenen Versuchen mit fetalem Rinderserum nicht bestätigt werden - auch nicht bei den von ihm verwendeten Zell-Linien HeLa und Hep-2. Diese Unterschiede sind vermutlich durch die unterschiedliche Versuchsdurchführung bedingt. Die Zellkulturen wurden nach Zusatz des SEB bei 37 °C inkubiert und sechs Tage lang täglich auf die Ausbildung mikroskopisch sichtbarer morphologischer Veränderungen (= CPE) geprüft. Als

positive Reaktion einer der getesteten SEB-Konzentrationsstufen (12, 5-25-50-100-200 mcg/ml) wurde gewertet, wenn in mindestens zwei von drei Röhrchen deutliche Zelldegenerationen wahrnehmbar waren.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß bei allen getesteten Zellkulturen - im Gegensatz zu MILONE (1962) und HALLANDER und BENGTSSON (1967) auch bei HeLa- bzw. Hep-2-Zellen - innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Zugabe des SEB ein deutlicher CPE zu beobachten war. Allerdings waren die Primärzellkulturen und die Hep-2-Zellen relativ wenig empfindlich (CPE erst ab 100 mcg/ml). Bei der Zell-Linie 75SD-G-376 lag die Nachweisgrenze demgegenüber bei 25 mcg/ml, bei den anderen vier Zell-Linien (HeLa, MDCK, RK-13, 75SD-G-420) bei 50 mcg/ml. Als gute Möglichkeit zur Wirkungssteigerung des SEB erwies sich eine kurzzeitige Erhitzung des Toxins (20 Sek. auf 95 °C). In diesen Fällen sank die Nachweisgrenze bei jeder Zellkultur zumindest um eine Konzentrationsstufe, bei MDCK, RK-13 und 75SD-G-420 sogar um zwei Stufen. Infolgedessen konnten mit den letztgenannten drei Zell-Linien wie auch mit der Zell-Linie 75SD-G-376 sogar noch Konzentrationen von 12, 5 mcg SEB/ml nachgewiesen werden. (Auch DANGERFIELD (1973) hatte im übrigen bei Verabfolgung von kurzzeitig auf 100 °C erhitztem SEB an Freiwillige eine Steigerung der biologischen Aktivität im Vergleich zum nativen SEB erkennen können.) Trotz gleich guter Empfindlichkeit sind diese vier Zellkulturen jedoch nicht in gleicher Weise zum Nachweis von gereinigtem SEB geeignet. Es ist vielmehr der aus einem Mischgliom von der Ratte gezüchteten Zell-Linie 75SD-G-420 aufgrund ihres schnellen Wachstums der Vorzug zu geben, während die Zell-Linie MDCK (Niere vom Hund) aufgrund des langsamen Wachstums für diese Zwecke kaum in Frage kommt.

Die Reaktion der Zellen auf Toxinzusätze hängt offensichtlich in viel größerem Maße von den Versuchsbedingungen und von der Reinheit des zugesetzten Toxins ab, als von ihrer unterschiedlichen Herkunft. Eine besondere Spezifität menschlicher Zellen ist aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse (auch der eigenen) nicht zu erkennen, jedoch wurden breit angelegte Untersuchungen zu dieser Frage auch noch nicht unternommen.

Wie aus den bisherigen Untersuchungen hervorgeht, wurde nämlich noch keine spezifisch sensible, eventuell mit einem Enterotoxinrezeptor ausgestattete Zell-Linie gefunden. Ebenso fehlt es an gezielten Untersuchungen, ob die Toxinempfindlichkeit der Zellkultur von dem jeweiligen Spenderorgan abhängt und wie weit sich Primärzellkulturen, diploide Zell-Linien und permanente Zell-Linien in ihrer Reaktion unterscheiden. Ein zentrales Kriterium der Reaktion von Zellen und Zellkulturen auf SEB ist möglicherweise die Art und der Grad der Differenzierung der Zellen. Solche, die einen niedrigen Differenzierungsgrad aufweisen, wie embryonale oder transformierte Zellen, lassen sich einerseits leichter als Zell-Linien vermehren, sind aber andererseits möglicherweise unempfindlicher gegenüber SEB als hochdifferenzierte Zellen, wie Nervenzellen, Leberzellen oder Darmepithel. Der gesteigerte Differenzierungsgrad ist durch eine Vermehrung bestimmter Zellstrukturen bzw. Zellorganellen (endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Lysosomen u.a.) bedingt. Mit der unterschiedlichen Struktur und Enzymausstattung läßt sich unterschiedliche Zellreaktion erklären. Dabei ergeben sich zwei Möglichkeiten der Enterotoxinwirkung, nämlich ein Angriff auf bestimmte Zellstrukturen, wobei die Stärke der Zellschädigung von deren Anzahl bestimmt wird, oder primär ein Angriff auf diese bestimmten Strukturen und in höherer Dosierung auch auf andere Zellbestandteile. Ein Beispiel dafür wäre eine Mitochondrienschädigung, wie sie bei der vakuolären Degeneration der beiden Zell-Linien von Nierenzellen (RK-13 und MDCK) in Frage kommen könnte. In diesem Zusammenhang seien die Beobachtungen von MERRILL und SPRINZ (1968) erwähnt, die Vakuolenbildung im Darmepithel bei Affen nach SEB-Gaben fanden. Diese Vakuolen erwiesen sich im Elektronenmikroskop als Degenerationsformen von Mitochondrien, eine Regeneration dieser Zellorganellen war nach 12 bis 24 Stunden zu beobachten. Auch bei Zellkulturen tritt eine teilweise Regeneration ein (nach ca. 72 Stunden), die mit dem Verschwinden der Vakuolen einhergeht. Grundsätzlich muß aber unterschieden werden zwischen einer Gewebereaktion in vivo, bei der humorale, zelluläre und Reizleitungsabläufe ineinandergreifen, und zwischen der Zellschädigung in der Kultur, in der eine Reaktion ohne das potenzierende

Allergie- und Entzündungssystem des Organismus abläuft. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war das Ziel der Nachweisbarkeit einer biologischen Wirkung von SEB jedoch erreicht. Zukünftige weiterführende Untersuchungen zur Eingrenzung der zellschädigenden Wirkungsmechanismen ist es vorbehalten, den Einfluß von SEB auf die einzelnen Zellorganellen zu berücksichtigen.

Aufgrund der guten Eignung der Zell-Linie 75SD-G-420 zur Ermittlung SEB-bedingter CPE wurde diese auch für die sich anschließenden Versuche zum Nachweis des Einflusses physikalischer bzw. chemischer Faktoren auf die Aktivität von SEB eingesetzt. Zur Absicherung dieser Ergebnisse lief noch stets eine zweite Zellkultur mit, und zwar entweder die Linie RK-13 (physikalische Einflüsse) oder die Linie 75SD-G-376 (chemische Einflüsse). Zusätzlich zur biologischen Aktivität des unbehandelten bzw. behandelten SEB wurde dessen serologische Aktivität im MANCINI-Test bestimmt. Dieser Vergleich sollte der Feststellung dienen, ob eine Abnahme der im Zellkulturtest bestimmten biologischen Aktivität mit einer ebensolchen der serologischen Aktivität einhergeht - wie es z. B. von READ und BRADSHAW (1966) sowie BERGDOLL (1969) angenommen wird - oder ob Unterschiede bestehen - wie die Publikation von DANGERFIELD (1973) vermuten läßt. Nur im ersteren Fall könnte man sich auch in Zukunft bei physikalischen oder chemischen Einflüssen unterworfenem SEB auf den serologischen Nachweis (z. B. MANCINI-Test) beschränken, während der serologische Nachweis sonst keine Aussage über die biologische Aktivität des behandelten SEB erlauben würde.

Bei den Erhitzungsversuchen war SEB nach 15 Min. bei 85 °C bzw. 95 °C so stark inaktiviert, daß der MANCINI-Test negativ ausfiel, während in den gleich lange auf 75 °C bzw. 99 °C erhitzten Proben noch eine geringe Restaktivität erhalten war. Diese sehr hohen Inaktivierungsraten sind darauf zurückzuführen, daß gereinigtes SEB verwendet wurde, das erheblich weniger hitzestabil ist als ungereinigtes (READ und BRADSHAW, 1966; SATTERLEE und KRAFT, 1969). Auch wenn die eigenen Ergebnisse aufgrund anderer Versuchsbedingungen (Erhitzungstemperatur, SEB-Konzen-

tration, Reinheitsgrad des SEB, Art und pH-Wert des Erhitzungsmediums) nicht direkt mit denen anderer Autoren (MANTHERLEY und FRAYET, 1969; JAMLANG et al., 1971; FUNG et al., 1973; REICHERT und FUNG, 1976; LOCHER, 1977) vergleichbar sind, ergibt sich hinsichtlich des Einflusses der Erhitzungstemperatur doch eine Übereinstimmung insofern, als die auf 99 °C erhitzten Proben geringere Vermulte der serologischen Aktivität aufweisen gegenüber den bei etwas niedrigeren Temperaturen erhitzten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der genannten Autoren, stand allerdings die Beobachtung, daß die Hitzemaktivierung nach 15 Min. bei 95 °C etwas stärker war als bei 75 °C. Die bei den parallel durchgeführten Zellkulturtests registrierten Werte für die biologische Aktivität waren mit jenen für die serologische Aktivität nicht vergleichbar. So waren bei den 15 Min. erhitzten SEB-Proben (die im MANCINI-Test keine oder nur noch eine sehr geringe Restaktivität aufwiesen) keine höheren SEB-Konzentrationen zur Auslösung des typischen CPE erforderlich, als bei den unerhitzten SEB-Proben (50 mcg/ml). Erst mit weiter zunehmender Erhitzungsdauer ging dann auch die biologische Aktivität des SEB stetig zurück, bis bei zwei Stunden (auf 99 °C) erhitztem SEB kein CPE mehr mit der höchsten verwendeten SEB-Konzentration (200 mcg/ml) erzielt werden konnte. Auch bei nur ganz kurzfristig (20 Sek.) erhitztem SEB bestand eine deutliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des MANCINI-Tests und des Zellkulturtests: Die biologische Aktivität war gegenüber der unerhitzten Kontrolle erheblich verstärkt (CPE bereits durch 12,5 mcg SEB/ml), die serologische Aktivität war stark vermindert (Restaktivität nur 10 bis 15 %). Zu ähnlichen Beobachtungen hinsichtlich der biologischen Aktivität von SEB war auch DANGERFIELD (1973) in Versuchen mit Freiwilligen gekommen. Er hatte festgestellt, daß einerseits mit 1,6 Min. auf 100 °C erhitztem SEB erheblich schwerere Enterotoxikosen ausgelöst wurden, als mit unerhitztem SEB und andererseits diese Symptome bei 25,4 Min. erhitztem SEB nur etwas weniger stark ausgeprägt waren als beim nativen SEB. Diese Ergebnisse weisen infolgedessen darauf hin, daß bei erhitztem SEB trotz negativen Ausfalls des serologischen Nachweises mit der Anwesenheit biologisch wirksamer Aktivitäten gerechnet werden muß. Dies

dürfte in erster Linie auf eine unterschiedliche Beeinflussung der biologischen und serologischen Aktivität von SEB zurückzuführen sein. Möglicherweise spielt jedoch auch die Denaturierung des SEB bei hohen Temperaturen eine gewisse Rolle. In diesem Zustand können die ausgefällten SEB-Moleküle nämlich nicht mehr in das antiserumhaltige Gel diffundieren, so daß u. U. ein gewisser Anteil des nicht inaktivierten SEB nicht erfaßt wird. Für diese Theorie spricht, daß 5 bzw. 30 Min. bei 99 °C erhitztes SEB nach anschließender Zerkleinerung der Flocken durch Ultraschall nur zu 70 bis 75 % inaktiviert war, während die Inaktivierungsrate ohne Ultraschallbehandlung mit ca. 90 % deutlich höher war (MANCINI-Test). In eine ähnliche Richtung gehen im übrigen Beobachtungen von SATTERLIFE und KRAFT (1969), die SEB in Gegenwart von Muskeleiweiß erhitzen und eine schnellere Inaktivierung als in Phosphatpuffer registrierten. Sie erklärten dies mit der Bindung des SEB an Fleischprotein und einer daraus folgenden Nichtverfügbarkeit für den Nachweis.

Bei den anderen geprüften physikalischen Faktoren waren nicht die bei der Erhitzung von SEB beobachteten Unterschiede zwischen serologischer und biologischer Aktivität festzustellen. Dies ist allerdings bei der Ultraschallbehandlung bzw. bei der Infrarotbestrahlung darauf zurückzuführen, daß unter den geprüften Bedingungen keine (Ultraschall) bzw. nur sehr geringe Aktivitätsverluste registriert wurden. (Auch LOCHER (1977) hatte unter etwa vergleichbaren Bedingungen bei Rohenterotoxin B nur eine geringe Abnahme der serologischen Aktivität beobachten können, obwohl in seinen Versuchen die den Inaktivierungseffekt mitbestimmende SEB-Ausgangskonzentration (JAMLANG et al., 1971) mit 7 mcg/ml deutlich geringer war.) Die mit ultraviolettem Licht bestrahlten SEB-Proben reagierten demgegenüber sowohl im serologischen als auch biologischen Test bereits nach einer Einwirkungszeit von 12 Stunden negativ (und damit erheblich schneller als bei Rohenterotoxin B (LOCHER, 1977)). Bei der UV-Bestrahlung erfuhr das SEB offensichtlich eine chemische Veränderung. Diese war gekennzeichnet durch das Ausflocken des SEB nach vierstündiger Bestrahlung, einem allmählich sich verstärkenden gelblichen

Farbton des Niederschlages sowie den nach 10 Stunden darauf auftretenden Mäusegeruch. Die zytotoxische Wirkung beruht vermutlich darauf, daß UV-Strahlen verschiedenartige Veränderungen an Aminosäuren hervorrufen (ELLIS und WELLS, 1941). So wird Tyrosin, das Bestandteil der wahrscheinlich antigen wirksamen Komponente des SEB ist (HUANG et al., 1975), durch UV-Strahlen zu Dihydroxyphenylalanin umgebaut und schließlich völlig zerstört. Ähnliches trifft auch auf die in SEB am häufigsten vorkommende Aminosäure, Asparaginsäure, zu. Außerdem ist noch in Betracht zu ziehen, daß es in wäßrigen Lösungen zur Bildung von Peroxiden kommt (BORNEFF, 1971), die - wie auch in den eigenen Versuchen festgestellt werden konnte - ihrerseits wiederum inaktivierend auf SEB wirken.

Da nicht auszuschließen war, daß die Rückstände der verwendeten Desinfektionsmittel selber CPE auslösen, mußten sie neutralisiert bzw. eliminiert werden. Auf die sonst übliche Anwendung sog. Reaktionsstopper wurde verzichtet, um zu vermeiden, daß durch diese bzw. sich aus Stopper und Desinfektionsmittlrückstand bildende Reaktionsprodukte falschnegative Resultate hervorgerufen würden. Die SEB-Proben wurden daher nach Ablauf der vorher festgelegten Desinfektionsmittel-Einwirkungszeit einem Dialyseverfahren unterzogen. Aufgrund der geringen Probenmenge konnten die Rückstände auf diese Weise innerhalb relativ kurzer Zeit aus den SEB-Proben entfernt werden.

Als Maßstab für die Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln wird bei der Trinkwasserdesinfektion das Redoxpotential des betreffenden Mittels im Wasser herangezogen (CARLSON, 1970). Oxidationsmittel bzw. Mittel mit einem hohen Oxidationspotential weisen eine Elektronenaffinität und damit ein positives Redoxpotential auf (z.B. Chlor + 1,3 V, Sauerstoff + 2,0 V). Von Bedeutung ist daher auch der pH-Wert der jeweiligen Lösung, da Oxidationsmittel umso stärker wirksam sind, je niedriger der pH-Wert ist (HOLLEMANN und WIBERG, 1964). Peressigsäure und Natriumhypochlorit sind starke Oxidationsmittel (über 1,5 V) und zusätzlich durch eine auf hohe Zerfallsgeschwindigkeit zurückzuführende schnelle Wirkung

charakterisiert. Beide Mittel sind gute Desinfektionsmittel (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967; BLOCK, 1977) und ebenso zur serologischen Inaktivierung von SEB geeignet (TERPLAN und ZAADHOF, 1974; HELBER, 1977). In den eigenen Versuchen konnte ebenfalls eine vollständige Inaktivierung der serologischen Aktivität erreicht werden, und zwar bei einer Peressigsäurekonzentration von 0,3 % (innerhalb von 30 Min.) bzw. bei NaOCl mit 500 ppm freiem Chlor (innerhalb von 60 Min.). Außerdem war auch eine komplette Inaktivierung der biologischen Aktivität zu beobachten, und zwar entweder parallel zur serologischen (Peressigsäure) oder schon bei geringerer Desinfektionsmittelkonzentration (bei NaOCl mit 100 ppm freiem Chlor). Bei einem serologisch negativen Befund kann daher nach Behandlung von SEB mit Peressigsäure oder NaOCl davon ausgegangen werden, daß auch keine Zytotoxizität mehr vorliegt. Das ebenfalls in die Versuche einbezogene Wasserstoffperoxid zerfällt bei Zimmertemperatur nur sehr langsam zu Wasser und Sauerstoff und ist ein schwächeres Oxidationsmittel als die beiden vorgenannten; gegenüber starken Oxidationsmitteln wirkt es sogar reduzierend. Organische Säuren, z. B. Phosphorsäure, wirken stabilisierend (HOLLEMANN und WIBERG, 1964). Wasserstoffperoxid gilt als Bleichmittel und mittelstarkes Desinfektionsmittel, z. B. für Wunddesinfektion (FRIMMER, 1969; BLOCK, 1977). CHU und BERGDOLL (1969) erzielten eine vollständige Detoxifizierung der biologischen Aktivität, nachdem sie H_2O_2 (pH 2,3) 12 Stunden auf gereinigtes SEB hatten einwirken lassen (bei 37 °C). HELBER (1977) hatte demgegenüber bei Rohenterotoxin B bei einer Einwirkungszeit von 60 Min. noch Restaktivitäten von mindestens 40 % beobachtet (MANCINI-Test). Bei den eigenen Versuchen wurde selbst bei einer Anwendungskonzentration von 14 % nach 60 Min. noch eine serologische Aktivität von 22 % nachgewiesen. Die biologische Aktivität wurde dagegen durch 10 % H_2O_2 bereits vollständig zerstört, so daß bei positivem serologischem SEB-Nachweis nicht unbedingt auch biologische Aktivität gegeben sein muß.

Ein Sonderfall in seiner Wirkung auf SEB stellt Chloramin T dar. In wäßriger Lösung wird Chlor - unter Bildung von unterchloriger Säure - abge-

geben, die weiter zu NaCl und Sauerstoff zerfällt. Darüberhinaus wird das Chloratom leicht auf andere, insbes. andere aromatische Verbindungen sowie Amide übertragen und schließlich kann das Toluolsulfonamid unter Hydrazonebildung mit Aminogruppen reagieren (NEUMÜLLER, 1972/77). Bei diesen Vorgängen wird das hohe Redoxpotential des Chloramins bzw. des Chlors in das Proteinmolekül eingebracht. Diese Potentialerhöhung wird z. B. bis zu einem gewissen Maße ausgenützt, um SEB für den Einsatz im Radioimmunoassay mit ^{125}I zu markieren (ORTH, 1977 a). Chloramin wird i. a. als wirksames, wenig aggressives Wäsche- und Oberflächendesinfektionsmittel eingesetzt (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1967). Der von HEILBER (1977) beschriebene vollständige Verlust der serologischen Aktivität von SEB nach Zugabe von Chloramin T konnte bei den eigenen Versuchen für Konzentrationen von mindestens 100 ppm freiem Chlor bestätigt werden. Auffällig war, daß zwar bei 50 und 100 ppm freiem Chlor keine Zytotoxizität zu registrieren war, dann aber mit steigenden Chloramin T-Konzentrationen wieder eine zunehmende Toxizität zu registrieren war. Kontrollversuche (ohne SEB) ergaben, daß der CPE bei den höheren Chloramin-Konzentrationen nicht Chloraminrückständen zuzuschreiben war. Vermutlich ist dieser Effekt auf die erwähnte Chloraminbedingte Potentialerhöhung und das gesteigerte chemische Reaktionsvermögen des SEB (ORTH, 1977 a) zurückzuführen.

Formaldehyd, ein schwaches Reduktionsmittel, das mit freien Amino- und Säureamidgruppen unter Methylenbrückenbildung und Polymerisation von Proteinketten reagiert (EGGENSPERGER, 1975), wurde als Detoxifizierungsmittel unter Erhaltung der Fähigkeit zur Antikörperbildung zwecks aktiver Immunisierung von Versuchstieren u. a. von BERGDOLL (1966), SILVERMAN et al. (1969) sowie WARREN et al. (1973) geprüft. Dabei wurden recht unterschiedliche Ergebnisse registriert. So berichtete BERGDOLL (1966) von einem vollständigen Verlust der serologischen Aktivität (bei pH 8,0), während SILVERMAN et al. (1969) nur eine geringe Abnahme (bei pH 7,3) beobachtet hatten. WARREN et al. (1973) versuchten dann diese Unterschiede mit unterschiedlichem pH zu erklären, da die

antigenen Determinanten des SEB mit steigendem pH stärker zerstört würden und, z. B. bei pH 9,0, nicht mehr aktiv seien. Die Untersuchungen von HELBER (1977), der weder bei pH 6,0 noch bei pH 9,0 eine Aktivitätsabnahme registrieren konnte, sprechen jedoch gegen diese Theorie. Die eigenen Versuche erbrachten nur in 3 bzw. 5 %iger Formaldehydlösung (nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen) eine geringe Abnahme der serologischen wie auch biologischen Aktivität.

Ein Vergleich der bei der Behandlung von gereinigtem SEB mittels physikalischer Verfahren (Erhitzung, Ultraschallbehandlung, UV-Bestrahlung, IR-Bestrahlung) bzw. Chemikalien (Peressigsäure, Wasserstoffperoxid, Natriumhypochlorit, Chloramin T) erzielten Ergebnisse zeigt somit, daß unter den geprüften Bedingungen eine vollständige Inaktivierung der serologischen und biologischen Aktivität nur bei Erhitzung (mindestens 2 Stunden bei 99 °C), Bestrahlung mit UV-Strahlen (12 Stunden), Zugabe von PES (30 Min.) oder NaOCl (60 Min.) sowie Chloramin T (120 Min.) zu beobachten war. (Bei Chloramin T ist allerdings die Einschränkung erforderlich, daß bei Einsatz höherer Chloramin-Konzentrationen wieder Zytotoxizität gegeben war.) Bei H_2O_2 wurde zwar auch eine vollständige Detoxifizierung der biologischen Aktivität (60 Min.) festgestellt, doch blieb selbst bei einer Konzentration von 14 % noch eine serologische Restaktivität von mehr als 20 %. Welche von den oben angeführten Möglichkeiten für die Inaktivierung von gereinigtem SEB eingesetzt wird, sollte u. a. unter Berücksichtigung des Einsatzbereiches entschieden werden.

Auch wenn in den meisten Fällen die Ergebnisse des serologischen SEB-Nachweisverfahrens mit denen des Zellkulturtests weitgehend übereinstimmen (und somit bei den betreffenden Verfahren auch in Zukunft auf den aufwendigeren biologischen Nachweis verzichtet werden kann), bestanden in Einzelfällen doch erhebliche Unterschiede. So war z. B. bei längerer Erhitzung auf Temperaturen unterhalb des Siedepunktes trotz bestehender bzw. gesteigerter Zytotoxizität keine serologische Aktivität in den SEB-Proben mehr nachweisbar, andererseits aber bei Zusatz von H_2O_2 trotz fehlender Zytotoxizität noch eine Antigen-Antikörper-Reaktion ausgeprägt. Von derartigen Unterschieden zwischen serologischer und biologischer

Restaktivität ist insbesondere der von Bedeutung, der bei dem üblicherweise allein durchgeführten serologischen Nachweis mit negativem Ergebnis ein falsches Bild hinsichtlich der biologischen Aktivität vermittelt. Es sollte daher zur Beurteilung des Dekontaminationseffektes zusätzlich zum serologischen Nachweis stets auch ein biologisches Nachweissystem eingesetzt werden - sofern nicht vorher bekannt ist, daß bei dem angewendeten Verfahren biologische und serologische Aktivität in gleichem Umfang verändert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden permanente Zell-Linien (Hep-2, HeLa und MDCK (ATCC), RK-13 (Flow), 75SD-G-376 und 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1978) sowie Primärkulturen (Kälberniere und Kälberlunge) auf ihre Eignung zum Nachweis der biologischen Aktivität von gereinigtem Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) geprüft. Eine Beeinträchtigung der Zellen durch SEB wurde angenommen, wenn lichtmikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen (CPE) auftraten.
2. Die Zell-Linien 75SD-G-376, 75SD-G-420 sowie RK-13 erwiesen sich unter den Versuchsbedingungen als gut geeignet. Die kleinste wirksame Dosis (MAD) betrug bei 75SD-G-376 25 mcg SEB, bei 75SD-G-420 und RK-13 jeweils 50 mcg/ml Zellkulturmedium. Eine vorhergehende Erhitzung des SEB für 20 Sek. auf 95 °C bewirkte eine Steigerung der Aktivität auf eine MAD von 12,5 mcg SEB/ml Medium.
3. Im zweiten Teil wurde mittels der geeigneten Zellkulturen getestet, ob und inwieweit die biologische Aktivität des SEB durch vorherige physikalische oder chemische Behandlungen verändert wird. Parallel dazu wurde die serologische Aktivität der behandelten SEB-Proben im MANCINI-Test bestimmt.
4. Eine vollständige biologische und serologische Inaktivierung des SEB durch physikalische Verfahren wurde bei Erhitzung auf Siedetemperatur (nach 2 Stunden) und bei UV-Bestrahlung (nach 12 Stunden) erreicht. Nach Erhitzung auf Temperaturen unterhalb des Siedepunktes wurde allerdings vereinzelt trotz negativen serologischen Ergebnissen eine unveränderte oder gesteigerte Zytotoxizität registriert. Bei Infrarotbestrahlung und Ultraschallbehandlung waren keine bzw. nur unwesentliche Aktivitätsverluste feststellbar.

5. Eine vollständige biologische und serologische Inaktivierung des SEB durch Chemikalien wurde unter den Prüfungsbedingungen mit Peressigsäure (30 Min.), NaOCl (60 Min.) und Chloramin T (120 Min.) erzielt. Bei höheren Chloramin-Konzentrationen trat eine sekundäre Zytotoxizität auf. Mit hohen H_2O_2 -Konzentrationen wurde zwar die biologische Aktivität vollständig zerstört, nicht aber die serologische. Bei Formaldehyd wurden nur geringe Aktivitätsverluste registriert.

SUMMARY

1. In the first section of this report strains of cell cultures (Hep-2, HeLa and MDCK (ATCC), RK-13 (Flow), 75SD-G-376 and 75SD-G-420 (STAVROU et al., 1978) as well as primary bovine kidney-cells and lung-cells were tested as an assay system for the biological activity of purified staphylococcal enterotoxin B (SEB). Microscopic visible morphologic changes of the cells were taken as an evidence of cytopathogenic effects of SEB.
2. The cell-strains 75SD-G-376, 75SD-G-420 and RK-13 proved to be well suited under test conditions. The minimum average dose (MAD) was 25 mcg SEB with 75SD-G-376 and 50 mcg/ml with 75SD-G-420 and RK-13.
3. In the second section tests were made with suitable strains if the biological activity of SEB was altered by chemical or physical treatment. Parallel at that the serological activity of the treated SEB-samples was determined by the MANCINI-test.
4. A complete biological and serological inactivation of SEB by physical procedure was obtained by heating at boiling temperature (after 2 h) and by UV-irradiation (after 12 h). After heating at temperatures below boiling temperature in spite of negative serologic results occasionally unchanged or increased cytotoxicity was noted. After infrared-irradiation and ultrasonic treatment no remarkable loss of activity was registered.
5. A complete inactivation of SEB by chemicals under test conditions was obtained with peracetic acid (30 min), NaOCl (60 min) and chloramine T (120 min). At higher chloramine T concentrations a secondary cytotoxicity appeared. At high H_2O_2 concentrations the biological activity was completely deleted but not the serological one. With formaldehyde only little loss of activity was observed.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H. (1969): Food borne infections and intoxications.

Academic Press, New York and London, 359 - 393

BARBER, M.A. (1914):

Milk poisoning due to a type of Staphylococcus albus occurring in the udder of a healthy cow.

Philippine J. Sci., Sec. B 9, 669 - 684

BERGDOLL, M.S. (1966):

Immunization of Rhesus monkeys with enterotoxin B.

J. Infect. Dis. 116, 191 - 196

DERSELBE (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 530 - 533

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL: Microbial Toxins.

Vol. 3, 265 - 326

Academic Press, New York and London

BLOCK, S.S. (1977):

Disinfection, sterilization and preservation.

Verlag Lea and Febiger, Philadelphia

BORNEFF, J. (1971):

Hygiene, ein Leitfaden.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

CARLSON, S. (1970):

Das Redoxmilieu als Faktor der Keimabtötung.

in: MEINCK, F.: Die Desinfektion von Trinkwasser.

Vortragsreihe 31, 21 - 38

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

CHU, F. S. und M. S. BERGDOLL (1969):

Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B.

1. Alkylolation and oxidation of methionine residues.

Biochem. Biophys. Acta 194, 279 - 286

CLARK, W. G. und H. L. BORISON (1963):

Pyrogenic effect of purified staphylococcal enterotoxin.

J. Pharmacol. 142, 237 - 241

CLARK, W. G., G. F. VANDERHOOF und H. L. BORISON (1962):

Emetic effect of purified staphylococcal enterotoxin in cats.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111, 205 - 206

CORDS, B. R. und S. R. TATINI (1973):

Applicability of heat-stable DNase assay.

J. Dairy Sci. 56, 1512 - 1514

CRAWLEY, G. J., J. N. BLACK, I. GRAY und J. W. BLANCHARD (1966 a):

Clinical chemistry of staphylococcal enterotoxin poisoning in monkeys.

Appl. Microbiol. 14, 445 - 450

CRAWLEY, G. J., I. GRAY, W. A. LEBLANG und J. W. BLANCHARD (1966 b):

Blood binding, distribution and excretion of staphylococcal enterotoxins in monkeys.

J. Infect. Dis. 116, 48 - 56

DANGERFIELD, H. G. (1973):

Effect of enterotoxins after ingestion by humans.

Vortrag, Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.

EGGENSPERGER, H. (1975):

Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen.

Hosp. Hyg., Gesundheitswesen und Desinfektion 67, 321 - 329

ELLIS, C. und A. A. WELLS (1941):

in: HEYROTH, F. F. (1941): The chemical action of ultraviolet rays.

Reinhold Publ. Corp., New York

FEINGOLD, M. J. (1967):

Interstitial pulmonary edema, an electrone microscope study of the pathology of staphylococcal enterotoxemia in Rhesus-monkeys.

Lab. Invest. 16, 912 - 924

zit. nach BERGDOLL, M. S. (1970)

FEY, H. und W. STIFFLER-ROSENBERG (1977):

Detection of staphylococcal enterotoxin B with a new modification of the enzyme linked assay.

Vortrag 36. Jahresversammlung der SGM, St. Gallen

FRIMMER, M. (1969):

Pharmakologie und Toxikologie.

Verlag F. K. Schattauer, Stuttgart - New York

FUNG, D. Y. C., D. H. STEINBERG, R. D. MILLER, M. J. KURANTNICK und T. F. MURPHY (1973):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C.

Appl. Microbiol. 26, 938 - 942

GANTZE, K. (1976):

Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln mittels

Froschspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.

Vet. Med. Diss., München

GRIGOROVA, M. und S. DANON (1968):

The effect of staphylococcal enterotoxin on tissue cultures.

Zbl. Bakt. I Orig. 206, 478 481

GUERIN, M.M., A.W. JACKSON und J.F. MORGAN (1962):

Tissue cultures and immunological studies with purified staphylococcal toxins.

Can. J. Publ. Health 53, 38 - 39

zit. nach HALLANDER, H.O. und S. BENGTSSON (1967)

HALLANDER, H.O. und S. BENGTSSON (1967):

Studies on the cell toxicity and species specificity of purified staphylococcal toxins.

Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 70, 107 - 119

HELBER, W. (1977):

Zur Inaktivierung von Staphylokokkenenterotoxin B mittels chemischer Verfahren.

Vet. Med. Diss., München

HODOVAL, L.F., E.L. MORRIS, G.J. CRAWLEY und W.R. BEISEL (1968):

Pathogenesis of lethal shock after intravenous staphylococcal enterotoxin B in monkeys.

Appl. Microbiol. 16, 187 - 192

HODOVAL, L.F., E.L. MORRIS, D.D. ELSBERRY und W.R. BEISEL (1967):

Effect of staphylococcal enterotoxin B on the electroencephalogram of monkeys.

Appl. Microbiol. 15, 403 - 406

HOLLEMAN, A. und F. WIBERG (1964):

Lehrbuch der anorganischen Chemie, 57. - 70. Auflage.

Verlag Walter de Gruyter, Berlin

HUANG, I.Y., E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1969):

The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins.

Jap. J. Med. S. 28, 73 - 75

JAMLANG, E.M., M.L. BARTLETT und H.E. SNYDER (1971):

Effect of pH, protein concentration and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 22, 1034 - 1040

JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC, P.E. KAUFFMAN und
J.T. PEELER (1971):

Staphylococcus enterotoxin B solidphase radioimmunoassay.

Appl. Microbiol. 22, 837 - 841

KENT, I.H. (1966):

Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in Rhesus monkeys.

Am. J. Pathol. 48, 386 - 396

KENT, T.H., H.R. JERVIS und J.G. KUHN (1966):

Enzyme histochemistry of acute staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in Rhesus monkeys.

Am. J. Pathol. 48, 667 - 673

KIENITZ, M. (1962):

Die enteralen Staphylokokken-Infektionen des Kindes.

Verlag S. Karger, Basel - New York

KIENITZ, M. und G. SCHMELTER (1964):

Untersuchungen über den Einfluß von Staphylokokkentoxinen auf Affen-nierenzellkulturen.

Zbl. Bakt. I Orig. 193, 447 - 453

KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN (1967):

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 3. Auflage.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

LACHICA, R.V., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):

Relationship among coagulase, enterotoxin and heat-stable desoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus.

Appl. Microbiol. 18, 126 - 127

LOCHER, E. (1977):

Zur Stabilität von Enterotoxin B gegenüber physikalischen Einflüssen.
Vet. Med. Diss., München

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immuno-
diffusion.

Immunochem. 2, 235 - 254

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974):

Virologische Arbeitsmethoden, Band 1.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

MERRILL, T.G. und H. SPRINZ (1968):

The effect of staphylococcal enterotoxin on the monkey jejunum.

Lab. Invest. 18, 114 - 128

MEYER, J.F. (1953):

Food poisoning.

New Engl. J. Med. 249, 804

zit. nach KIENITZ, M. (1962)

MILONE, N.A. (1962):

Studies on the use of tissue culture for the bioassay of staphylococcal
enterotoxin.

J. Food Sci. 27, 501 - 507

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):

Staphylococci and their significance in foods.

Elsevier Scientific Publ. Comp., New York

MORRIS, E.L., L.F. HODOVAL und W.R. BEISEL (1967):

The unusual role of the kidney during intoxication of monkeys by
intravenous staphylococcal enterotoxin B.

J. Infect. Dis. 117, 273 - 284

NEUMÜLLER, O.-A. (1972/77):

Römpfs Chemie-Lexikon, 7. Auflage.

Frank'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

NORMANN, S. J. und R. T. JOHNSEY (1968):

Absence of circulatory transport-protein for staphylococcal enterotoxin B.

J. Bact. 95, 1178 - 1179

NORMAN, S. J., R. F. JAEGER und R. T. JOHNSEY (1969):

Pathology of experimental enterotoxemia. The in vivo localization of staphylococcal enterotoxin B.

Lab. Invest. 20, 17 - 25

ORTH, D. S. (1977 a):

Iodination of staphylococcal enterotoxin B by use of chloramine T.

Appl. Microbiol. 33, 824 - 828

DERSELBE (1977 b):

Statistical analysis and quality control in RIA for staphylococcal enterotoxin A, B and C.

Appl. Microbiol. 34, 710 - 714

OUCHTERLONY, Ö. (1948):

Antigen-antibody reactions in gels.

Arkiv kemi. Min. och Geol. 26 B, 1 - 9

zit. nach HELBER, W. (1977)

OU'DIN, J. (1952):

III. Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction.

B. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.

Methods Med. Res. 5, 335 - 378

PALMER, E. D. (1951):

The morphologic consequences of acute exogenous (staphylococci) gastroenteritis on the gastric mucosa.

Gastroenterology 19, 462 - 475

PAUL, J. (1975):

Cell and tissue culture.

Verlag Churchill Livingstone, London - New York

POBER, Z. und G.J. SILVERMAN (1977):

Modified radioimmunoassay determination for staphylococcal enterotoxin B in foods.

Appl. Microbiol. 33, 620 - 625

RAJ, H.D. und M.S. BERGDOLL (1969):

Effect of enterotoxin B on human volunteers.

J. Bact. 98, 833 - 834

RAKAROWA, N., S. STEFANOWA und I. STANKOWA (1971):

Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin A in Gewebekulturen.

Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A 218, 45 - 48

RAPOPORT, M.I., L.F. HODOVAL und W.R. BEISEL (1967):

Influence of thorotrast blockade and acute renal artery ligation on disappearance of staphylococcal enterotoxin B from blood.

J. Bact. 93, 779 - 783

READ, R.B. und J.G. BRADSHAW (1966):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in Veronal buffer.

Appl. Microbiol. 14, 130 - 132

REICHERT, C.A. und D.Y.C. FUNG (1976):

Thermal inactivation and subsequent reactivation of staphylococcal enterotoxin B in selected liquid foods.

J. Milk Food Technol. 39, 516 - 520

RUBARTH, S. und N.E. BJÖRKLUND (1972):

Regressive Veränderungen.

in: FREI, W.: Allgemeine Pathologie. (1972)

Verlag Paul Parey, 118 - 241

SATTERLEE, L.D. und A.A. KRAFT (1969):

Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 17, 906 - 909

SAUNDERS, G.C. (1974):

Serologic testing with enzyme-labelled antibodies (ELA).

17th Annual Proc. American Association of Veterinary Laboratory

Diagnosticians, 311

SAUNDERS, G.C. und M.L. BARTLETT (1977):

Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A.

Appl. Microbiol. 34, 518 - 522

SCHAEFFER, W.I. (1970):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures.

Infect. Immun. 1, 455 - 458

SCHAEFFER, W.I., J. GABLIKS und R. CALITIS (1966):

Interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 91, 21 - 26

DIESELBEN (1967):

Interference by trypsin in the interaction of staphylococcal enterotoxin B with cell cultures of human embryonic intestine.

J. Bact. 93, 1489 - 1492

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO,

D.A. DUNNERY und M.S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochem. 4, 1011 - 1016

SCHEUBER, H.P. (1977):

Hemmung der Inaktivierung konjugierter Bakteriophagen als Methode zum empfindlichen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B.

Vet. Med. Diss., München

SCHWEER, H.-H. und R. FRIEDEL (1978):

Neue Entwicklungen und Trends in der radioimmunologischen Analytik.
GIT Labor-Medizin, Heft 1/78

SENN, A. und P. LUNDGAARD-HANSEN (1956):

Zum Problem der Staphylokokkenenteritiden nach Antibiotikaverabreichung.
Helv. Med. Acta 23, 1
zit. nach KIENITZ, M. (1962)

SHEAHAN, D.G., H.R. JERVIS, A. TAKEUCHI und H. SPRINZ (1970):

The effect of staphylococcal enterotoxin on the epithelial mucosubstances
of the small intestine of Rhesus monkeys.
Am. J. Pathol. 60, 1 - 11

SILVERMAN, S.J., D.A. ESPESETH und E.J. SCHANTZ (1969):

Effect of formaldehyde on the immunochemical and biological activity
of staphylococcal enterotoxin B.
J. Bact. 98, 437 - 442

SIMON, E. (1978):

In Vorbereitung.
Vet. Med. Diss., München

SIMON, E. und G. TERPLAN (1977):

Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test.
Zbl. Vet. Med. B 24, 842 - 844

SINELL, H. J. (1976):

Staphylokokken Enterotoxine in Lebensmitteln.
Med. Klin. 71, 1165 - 1171

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137

STAAB, E.V., J. NIEDERHUBER, D.A. RHODA, C.S. FAULKNER I
und W.R. BEISEL (1969):

Role of the kidney in staphylococcal enterotoxemia.

Appl. Microbiol. 17, 394 - 398

STAVROU, D. und K.G. HAGLID (1973):

Morphologische und immunologische Untersuchungen zur Histogenese
experimenteller Hirntumoren.

J. Neurol. Sci. 20, 39 - 50

STAVROU, D., A.P. ANZIL, W. WEIDENBACH und H. RODT (1977):

Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in gliomas.

J. Neurol. Sci. 33, 275 - 282

STAVROU, D., U. OSTERKAMP, B. SCHRÖDER, A.P. ANZIL und
K. ZÄNKER (1978):

Selected morphological immunocytochemical and growth characteristics
of three experimental rat gliomas and of their cells in vitro.

Expl. Cell Biol. (im Druck)

SUGIYAMA, H. (1966):

Endotoxine-like responses induced by staphylococcal enterotoxin.

J. Infect. Dis. 116, 162 - 170

SUGIYAMA, H. und T. HAYAMA (1964):

Comparative resistance of vagotomized monkeys to intravenous vs.
intra gastric staphylococcal enterotoxin challenges.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 243 - 246

DIESELBEN (1965):

Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxins
in monkeys.

J. Infect. Dis. 115, 330 - 335

SUGIYAMA, H. und E.M. McKISSIC (1966):

Leukocytic response in monkeys challenged with staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 92, 349 - 352

SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1958):

Increased serum glutamic oxaloacetic transaminase of monkeys following oral administration of staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 93, 33 - 36

DIESELBEN (1962):

Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin.

J. Infect. Dis. 111, 233 - 238

SUGIYAMA, H., K.L. CHOW und L.R. DRAGSTEDT (1961):

Study of emetic receptor sites for staphylococcal enterotoxin in monkeys.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 108, 92 - 95

SUGIYAMA, H., E.M. McKISSIC und T. HAYAMA (1964):

Hyperfibrinogenemia and thrombocytopenia after staphylococcal enterotoxin.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 117, 726 - 729

SURGALLA, M.J. und K.E. HITE (1945):

A study of enterotoxin and alpha and beta hemolysin production by certain staphylococcus cultures.

J. Infect. Dis. 76, 78 - 82

TERPLAN, G. und E. SIMON (1976):

Detection of staphylococcal enterotoxin in foods with regard to ultra-filtration and precipitation methods.

Lecture at National Research Centre, Cairo, Oct. 23rd

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1974):

Detoxifizierung von Toxinen mikrobiellen Ursprungs.

FBWM 74/4 Gutachten

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1976):

Unveröffentlichte Untersuchungen.

URBACH, H., H. OEHRING und H. BRUNNENMANN (1968):

Versuche zum Nachweis des Staphylokokken-Enterotoxins mit Hilfe von Zellkulturen.

Arch. Hyg. 152, 504 - 508

DE WAART, J., F. VAN AKEN und H. POUW (1972):

Detection of orally toxic microbial metabolites in foods with bioassay systems.

Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. 222, 96 - 114

WALLHÄUSSER, K.H. und H. SCHMIDT (1967):

Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie.

Verlag Georg Thieme, Stuttgart

WARREN, J.R., L. SPERO und J.F. METZGER (1973):

Antigenicity of formaldehyd-inactivated staphylococcal enterotoxin B.

J. Immunol. 111, 885 - 892

WILSON, B.J. (1959):

Comparative susceptibility of chimpanzees and Macaca mulatta monkeys to oral administration of partially purified staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 78, 240 - 242

WESTPHAL, W.H. (1963):

Physik - Ein Lehrbuch, 22. - 24. Auflage.

Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg

ZISCHKA, W. (1950):

Tödliche Gastroenterokolitis ungewöhnlicher bakterieller Genese bei einem Kind.

Wien. klin. Wschr. 62, 409

zit. nach KIENITZ, M. (1962)

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich für Überlassung des Themas und für die Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. D. Stavrou danke ich für die freundliche Überlassung der Zellkulturen 75SD-G-376 und 75SD-G-420 sowie seine Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine Beratung und Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

LEBENS LAUF

Am 17. Januar 1950 wurde ich als Sohn des Landwirtes Friedrich Zietzer und seiner Ehefrau Helma, geb. Seybold, in Frankfurt/Main geboren.

Ich besuchte die Volksschule Bad Vilbel bis zum Übertritt in die Augustinerschule in Friedberg/Hessen, wo ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1969 studierte ich Chemie-Mathematik an der Universität Gießen. Dann wurde ich für achtzehn Monate zum Wehrersatzdienst einberufen.

Im Wintersemester 1971 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität Gießen und führte es weiter an der Universität München vom siebten Semester im November 1974 bis zur Beendigung mit dem Staatsexamen im November 1976. Meine Approbation erhielt ich im Januar 1977. Zum Jahresanfang 1977 begann ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch.

